

**ANAEROBER ABBAU VON METHOXYLIERTEN
AROMATEN DURCH EINE GEMEINSCHAFT
VON MIKROORGANISMEN**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II

der

UNIVERSITÄT ZÜRICH

von

JEAN-PIERRE KAISER

von Degersheim (SG)

Begutachtet von

Prof. Dr. R. Bachofen

Zürich 1987

Zentralstelle der Studentenschaft



**ANAEROBER ABBAU VON METHOXYLIERTEN
AROMATEN DURCH EINE GEMEINSCHAFT
VON MIKROORGANISMEN**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II

der

UNIVERSITÄT ZÜRICH

von

JEAN-PIERRE KAISER

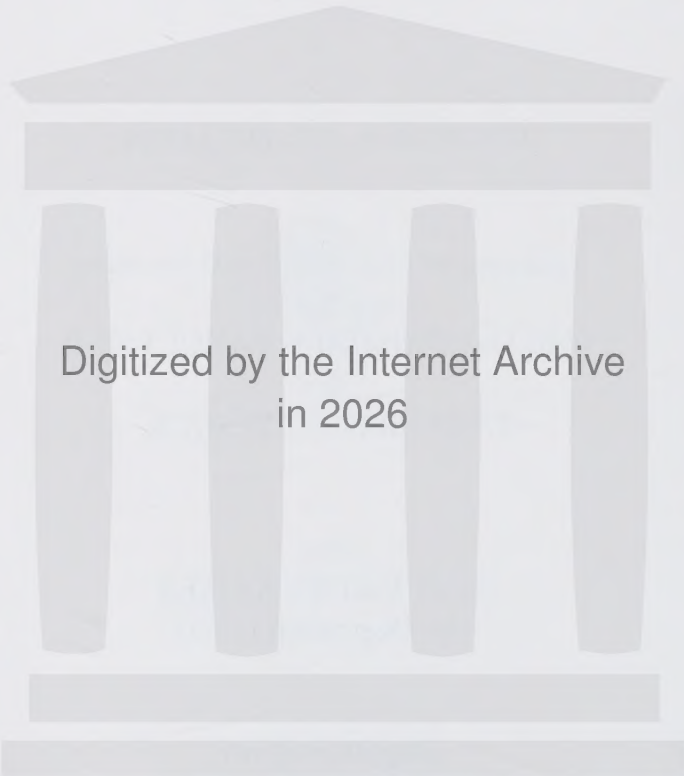
von Degersheim (SG)

Begutachtet von

Prof. Dr. R. Bachofen

Zürich 1987

Zentralstelle der Studentenschaft



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Einleitung	2
Resultate	
1. Abbauversuche mit der Mischkultur	18
2. Isolierung von drei Reinkulturen aus der Mischkultur	20
3. Charakterisierung des demethylierenden Organismus <i>Desulfotomaculum orientis</i> Stamm Zürich	20
4. Umstellung von Sulfatreduktion auf Fermentation, respektive Umstellung von Fermentation auf Sulfatreduktion durch <i>Desulfotomaculum orientis</i> Stamm Zürich	30
5. Charakterisierung von gallussäureabbauenden <i>Pelobacter</i> <i>acidigallici</i>	34
6. Mineralisierung von Acetat durch <i>Methanococcus mazei</i>	42
7. Abbau von 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure durch die Bakterien- gemeinschaft <i>Desulfotomaculum orientis</i> Stamm Zürich und <i>Pelobacter acidigallici</i>	44
Diskussion	47
Literaturverzeichnis	52
Anhang:	
Kultivierungsmethoden	63
Analytische Methoden	67
Curriculum vitae	86
Verdankung	87

Zusammenfassung

Aus dem Sediment des Zürichsees ist eine aromatenabbauende Gemeinschaft von Mikroorganismen isoliert worden. Diese Mischkultur hat die Fähigkeit, Syringasäure vollkommen zu Methan und Kohlendioxid abzubauen (50). Als Zwischenprodukte entstehen aus Syringasäure das korrespondierende Hydroxyderivat (Gallussäure), Butyrat und Acetat. Gallussäure wird anschliessend von einem Aromatenspalter in einer Homoacetatfermentation weiter abgebaut. Ein acetotrophes Methanbakterium disproportioniert schlussendlich das anfallende Acetat zu Methan und Kohlendioxid. Die Bakterien dieser Dreiergemeinschaft wurden einzeln isoliert und charakterisiert.

Der demethylierende Organismus (*Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich) dieser Mischkultur spaltet die Ätherbindung zwischen dem Aromaten und der Methylgruppe und bildet das korrespondierende Hydroxyderivat. Der aromatische Ring bleibt dabei intakt. Die Methylgruppen werden durch dieses Bakterium zu Acetat und Butyrat fermentiert. Anstelle von methoxylierten Aromaten kann *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich auch Methanol verwerten. Im weiteren hat der Organismus die Fähigkeit, Methanol unter sulfatreduzierenden Bedingungen abzubauen. Im Unterschied zum fermentierenden Methanolabbau wird in Gegenwart von Sulfat kein Acetat gebildet. Als Elektronenakzeptor dient nicht mehr Kohlendioxid, sondern Sulfat, das zu Sulfid reduziert wird. Der Kohlenstoff des Methanols wird dabei zu Kohlendioxid oxidiert.

Bei dem aus der Dreiergemeinschaft isolierten, ringspaltenden Organismus (*Pelobacter acidigallici*) handelt es sich um ein Bakterium, das aromatische Substanzen, die drei Hydroxygruppen in bestimmten Positionen aufweisen, in einer Homoacetatfermentation abbauen kann. Als Substrate dienen Gallussäure (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure), Pyrogallol (1,2,3-Trihydroxybenzol), Phloroglucinol (1,3,5-Trihydroxybenzol), 2,3,4-Trihydroxybenzoesäure und 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure. Aus einem Mol Trihydroxybenzoesäure entstehen ein Mol Kohlendioxid und drei Mole Acetat, aus einem Mol Trihydroxybenzol drei Mole Acetat. Da bei dieser Fermentation kein Wasserstoff freigesetzt wird, ist der ringspaltende Organismus nicht auf die Anwesenheit eines wasserstoffverwertenden Bakteriums angewiesen.

Der dritte Organismus dieser mikrobiellen Gemeinschaft, ein acetotrophes Methanbakterium (*Methanococcus mazei*), besorgt den Abbau des anfallenden Acetats aus Demethylierung und Aromatenspaltung. Acetat wird dabei zu Methan und Kohlendioxid disproportioniert.

Im weiteren wurde gezeigt, dass eine Zweiergemeinschaft, bestehend aus *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich und *Pelobacter acidigallici*, fähig ist 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure abzubauen.

Einleitung

1. Allgemeines über den Abbau von Aromaten

Xenobiotische Substanzen werden, wenn sie sich anhäufen, in der Natur schlecht oder nicht abgebaut und belasten das Ökosystem. Substanzen mit aromatischen Strukturen im Molekül werden oft zu Problemchemikalien, wenn sie in sauerstofffreie Standorte gelangen. Beispiele für solche Habitate bilden überschwemmte Böden, Sedimente, anaerobe Süß- und Meerwasser und oft Grundwasser. Viele Umweltchemikalien enthalten aromatische Strukturen im Molekül. Holzproduzierende Pflanzen bilden eine wichtige natürliche Quelle von aromatischen Substanzen. Lignin (Holzstoff) ist neben Cellulose das zweithäufigste organische Polymer auf der Erde. 15 bis 38 % des Trockengewichtes von Nadel- und Laubhölzern bestehen aus Lignin. Diese Substanz ist sehr komplex aufgebaut und biologisch schwer abbaubar (18). Lignin ist ein wichtiger Lieferant von phenolischen und aromatischen Substanzen für die Humusbildung im Boden.

Neben höheren Pflanzen bilden auch Algen und Pilze aromatische Substanzen; sogar halogenierte Verbindungen kommen darunter vor (17, 82). 2,4-Dichlorphenoxyacetat ist ein natürlicher Metabolit von *Penicillium* sp. und kann auch als Herbizid eingesetzt werden. Gewisse Pilze bilden chlorierte Antibiotika mit aromatischen Ringen (Chloramphenicol, Chlortetracyclin (17)). Aus marinen Braunalgen konnten bromsubstituierte Benzolringe isoliert werden (17). Die in Proteinen vorhandenen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin enthalten ebenfalls aromatische Komponenten. Weitere Quellen für aromatische Substanzen sind Erdöl und die verschiedenen daraus synthetisierten Produkte, wie Farbstoffe, Lösungsmittel, Kunststoffe und Agrochemikalien.

Aromatische Verbindungen, vor allem komplexe Polymere, sind anaerob nur schwer abbaubar. So gibt es beispielsweise kein Habitat, in dem der Ligninabbau schnell vor sich geht. Colberg und Young (19) konnten zeigen, dass Ligninfragmente mit einem Molekulargewicht bis 600 Dalton von einer adaptierten methanogenen Mischkultur teilweise zu Methan und Kohlendioxid abgebaut werden konnten. Aus Tiermägen wurden viele Bakterien isoliert, die fähig sind, aromatische Verbindungen unter anaeroben Bedingungen abzubauen. Auch Bakterien aus dem Intestinaltrakt holzfressender Termiten können Lignin anaerob abbauen (14, 80).

Halogenierte aromatische Substanzen sind im allgemeinen sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen abbaubar (87, 98). Für den Abbau von halogenierten Aromaten sind Art und Position der Substituenten entscheidend (86). So können Brom- und Jodverbindungen leichter abgebaut werden als ihre entsprechenden Chlor- und Fluoranaloge. Ein Versuch mit Monochlorphenol zeigt, dass diese Substanz nur abgebaut werden kann,

wenn sich das Halogen in ortho-Position befindet (10). Der erste Schritt beim anaeroben Abbau von halogenierten Substanzen wird durch die reduktive Dehalogenierung eingeleitet. Dabei wird das Halogen durch ein Wasserstoffatom ersetzt und das betreffende Kohlenstoffatom dabei formal reduziert. Die reduktive Dehalogenierung ist oftmals auf einen cometabolischen Prozess angewiesen. Da die Kohlenstoffatome durch die Abspaltung des Halogens reduziert werden, ist ein zweites Substrat notwendig, das die notwendigen Elektronen zur Verfügung stellt.

Das Vorhandensein von Substituenten wie Carboxy-, Hydroxy- und Methoxygruppen erleichtert im allgemeinen den Abbau von aromatischen Verbindungen. Andere Substituenten, wie Halogene, Amino-, Nitro- und Sulfidogruppen erschweren dagegen den Abbau dieser Substanzen (45).

Viele Pestizide können durch Cometabolismus abgebaut werden, d.h. dass das abzubauen Substrat nicht die einzige Kohlenstoffquelle für einen Organismus darzustellen braucht. So berichtete Caseley (16) über den Abbau des Fungizids Pentachlornitrobenzol durch *Streptomyces aurefaciens*. Dieses Biozid wird beispielsweise nur während der aktiven Wachstumsphase dieses Organismus abgebaut. Das Bakterium ist deshalb auf einen cometabolischen Prozess angewiesen. Auch DDT scheint einem mikrobiellen Abbauprozess zu unterliegen. Wedemeyer (106, 107) beschrieb den Abbau von DDT zu pp-Dichlordiphenylmethan. Auch dieser Prozess ist cometabolisch, da für den Organismus kein Kohlenstoff für das Wachstum frei wird. Das Produkt (pp-Dichlordiphenylmethan) kann von einem zweiten Organismus, einer *Hydrogenomonas* sp. zu p-Chlorphenylacetat weiter abgebaut werden (30).

Der Cometabolismus von chlorierten Agrochemikalien endet selten in einer kompletten Mineralisierung des Moleküls. Der Abbau von Pestiziden kann aber die Toxizität der Ausgangsprodukte vermindern und bei natürlichen mikrobiellen Populationen, wie sie in einem Ökosystem vorkommen, kann zum Teil ein vollständiger Abbau von xenobiotischen Substanzen stattfinden. Mikesell und Boyd (66) haben gezeigt, dass Kulturen, die aus Abwasserschlämme isoliert wurden und während mehr als zwei Jahren auf Monochlorphenolen (2-Chlorphenol, 3-Chlorphenol und 4-Chlorphenol) gezogen wurden, fähig sind, in Gemeinschaft Pentachlorphenol (PCP) abzubauen. Inkubationen mit ^{14}C -PCP haben gezeigt, dass 66 % des zugeführten ^{14}C zu $^{14}\text{CO}_2$ und $^{14}\text{CH}_4$ mineralisiert wurde. Andererseits kann aber auch eine Zunahme der Toxizität gegenüber dem Substrat durch mikrobielle Modifikationen stattfinden. Giger (35) hat beispielsweise festgestellt, dass beim Abbau von 4-Alkylphenolpolyethoxylaten schwerabbaubare Metaboliten, wie 4-Alkylphenolmono- und -diethoxylate gebildet werden, die weiter zum giftigen 4-Nonylphenol umgewandelt werden können.

Allgemein kann gezeigt werden, dass oftmals nur Gemeinschaften von Mikroorganismen in der Lage sind, aromatische Substanzen vollständig

abzubauen. Der Energiegewinn eines spezifischen Reaktionsschrittes, bezogen auf den gesamten Abbau, ist häufig klein und kann nicht losgelöst vom gesamten Metabolismus betrachtet werden. Der Energiegewinn an einer individuellen Abbaureaktion wird abhängen von der An- oder Abwesenheit anderer Bakterientypen, die die Umgebungsbedingungen modifizieren können (56).

Für die Aromatenspaltung wird zwischen aerobem und anaerobem Abbau unterschieden.

2. Aerober Abbaueweg:

Der aerobe Abbaueweg wird seit längerer Zeit untersucht und die einzelnen Abbauschritte sind bekannt (20, 83). Hydrogenasen verändern den aromatischen Ring so, dass eine Ringspaltung durch Oxygenasen ablaufen kann. Die aromatischen Verbindungen liegen dazu als Catechol oder Protocatechusäure vor. Durch Oxygenasen (Dioxygenasen bei nicht phenolischen Aromaten, Monooxygenasen bei phenolischen Aromaten) werden Sauerstoffatome eingeführt.

Die aerobe Ringspaltung kann dabei auf zwei Arten erfolgen: Spaltungen zwischen zwei benachbarten Hydroxygruppen (ortho-Spaltung) oder Spaltung zwischen dem hydroxylierten und dem benachbarten nicht hydroxylierten Kohlenstoffatom (meta-Spaltung). Von einem Mikroorganismenstamm wird in der Regel nur einer der beiden möglichen Abbauewege für den Abbau eines bestimmten Substrates benutzt.

Der ortho-Abbaueweg führt zu cis-cis-Muconsäure bei der Spaltung von Catechol, respektiv β -Carboxy-cis-cis-muconsäure bei der Spaltung von Protocatechusäure. Die meta-Spaltung führt zu α -Hydroxymuconsemialdehyd beim Abbau von Catechol, respektive zu α -Hydroxy- γ -carboxymuconsemialdehyd beim Aufbrechen von Protocatechusäure.

3. Anaerobe Abbauewege:

Beim anaeroben Abbau ist eine Ringspaltung unter folgenden Bedingungen beobachtet worden: bei Nitratreduktion, Sulfatreduktion, Photometabolismus und bei Fermentation.

Aromatenabbau gekoppelt mit Nitratreduktion

Oshima (68) beschrieb den Abbau von aromatischen Substanzen unter gleichzeitiger Nitratreduktion durch fakultativ anaerobe Bakterien. Es konnte eine *Pseudomonas* sp. isoliert werden, die Protocatechusäure aerob oxidiert

und die auf Nitratreduktion umzustellen vermag, wenn der Sauerstoff entzogen wird. Es wird deshalb angenommen, dass die Ringspaltung sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen dem gleichen Abbauweg folgt. Unter anaeroben Bedingungen dient Nitrat als Wasserstoffakzeptor.

Fabig et al. (29) andererseits zeigten, dass der Benzoesäureabbau unter strikt anaeroben, nitratreduzierenden Bedingungen nicht ablaufen kann, ohne dass Spuren von Sauerstoff vorhanden sind. Die Vermutung liegt nahe, dass die Spaltung von Benzol aerob erfolgt und nur der Abbau der Spaltprodukte mit der Nitratatmung gekoppelt ist.

Andererseits haben Taylor et al. (88) eine *Pseudomonas* sp. isoliert, die anaerob Benzoesäure nur unter Nitratreduktion abbauen kann. Aerob wächst dieses Bakterium auf verschiedenen aromatischen Substraten. Anaerob wird die unter Sauerstoffatmosphäre gebildete Oxygenase unterdrückt. Diese Beobachtungen sprechen daher eher für verschiedene Abbaewege unter aeroben respektiv nitratreduzierenden Verhältnissen.

Aromatenabbau gekoppelt mit Sulfatreduktion

Balba und Evans (3) haben eine syntrophe, sulfatreduzierende Mischkultur, bestehend aus *Pseudomonas aeruginosa* und *Desulfovibrio vulgaris*, beschrieben, die Benzoesäure unter sulfatreduzierenden Bedingungen abbaut. Der sulfatreduzierende Organismus ist aber an der aromatischen Ringspaltung nicht beteiligt, sondern stellt dem *Pseudomonaden* organische Säuren zur Verfügung, die für das anaerobe Wachstum auf Benzoesäure notwendig sind. Widdel (111) hat drei morphologisch unterschiedliche Arten sulfatreduzierender Bakterien isoliert (*Desulfococcus multivorans*, *Desulfosarcina variabilis* und *Desulfonema magnum*), die Benzoesäure vollständig zu Kohlendioxid oxidieren. Neben Benzoesäure können diese Organismen auch Phenylacetat, Phenylpropionat und einige weitere Monohydroxybenzoesäuren verwerten.

Photometabolischer Aromatenabbau

Dutton und Evans (24) beschrieben *Rhodopseudomonaden*, die anaerob im Licht auf Benzoesäure wachsen. Es wird angenommen, dass Benzoesäure zuerst reduziert und anschliessend durch eine Hydratation eine Hydroxygruppe in das Produkt eingeführt wird. Anschliessend soll eine Wasserstoffabspaltung und die Bildung einer Oxogruppe stattfinden. Durch eine weitere Hydratation folgt dann die Aufspaltung des Kohlenstoffrings.

Die ursprüngliche Annahme, dass das Substrat durch molekularen Sauerstoff vorerst gespalten würde, hat sich nicht bestätigt. Der Zutritt von Luftsauerstoff zu Kulturen im Licht führt zu einer vollständigen Blockierung des Benzoesäureabbaus.

Fermentierender Aromatenabbau

Streptococcus bovis (93), *Coprococcus* sp. (94), *Pelobacter acidigallici* (78) und *Eubacterium oxidoreducens* (58) sind die einzigen Organismen, die in Reinkultur aromatische Substanzen fermentativ spalten können. Alle können Phloroglucinol abbauen. *Pelobacter acidigallici* kann neben Phloroglucinol auch Pyrogallol, Gallussäure und 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure als Substrat verwerten.

Verschiedene Aromaten werden auch durch methanogene Mischkulturen abgebaut. Obwohl Methanbakterien nicht direkt am Aromatenabbau beteiligt sind, sind sie für die Entfernung der Fermentationsprodukte wie Acetat und Wasserstoff durch Umwandlung in Kohlendioxid und Methan von Bedeutung. Der gesamte Abbauvorgang wird dadurch thermodynamisch günstig beeinflusst. Healy (41) hat den Metabolismus von verschiedenen aromatischen Substanzen wie Phenol, Catechol, Vanillinsäure, Ferulasäure, Zimtsäure, Syringasäure, p-Hydroxybenzoesäure, Benzol und Protocatechusäure unter methanogenen Bedingungen untersucht und gefunden, dass mehr als die Hälfte des organischen Kohlenstoffs dieser aromatischen Substanzen zu Methan umgesetzt wird.

Der fermentierende anaerobe Abbau von Benzoesäure verläuft vermutlich nach dem reduktiven Abbauweg, der 1977 von Evans (28) postuliert wurde. Dabei entsteht durch Hydrierung von Benzoesäure Cyclohex-1-encarboxylsäure. Durch eine Dehydrierung wird die Hydroxygruppe zur Oxogruppe und eine Hydratation führt zur Aufspaltung des Kohlenstoffringes. Der weitere Abbau zu kürzeren Fettsäuren dürfte über β -Oxidation erfolgen.

Beim anaeroben Abbau von aromatischen Substanzen kann eine Ringspaltung unter nitrat- und sulfatreduzierenden Bedingungen, als auch die photometabolische und fermentierende Ringöffnung beobachtet werden. Trotz intensiven Anstrengungen ist der exakte Mechanismus der Ringspaltung von Aromaten noch nicht geklärt.

Man muss annehmen, dass die Konzentrationen an Zwischenprodukten in den Zellen so gering sind, dass diese kaum nachzuweisen und zu identifizieren sind. Grbić-Galić (37) konnte beim Abbau von Ferulasäure durch eine Mischkultur, bei der die Methanbakterien mit Bromäthansulfonsäure (BESA) gehemmt wurden, über zehn verschiedene Zwischenprodukte nachweisen. Da der Abbau durch eine Mischkultur erfolgte, ist es nicht möglich, den Abbauweg zu bestimmen. Es ist unmöglich, Zwischenprodukte, die bei der Ringspaltung auftraten, von solchen, die auf Seitenreaktionen von nicht ringspaltenden Organismen zurückzuführen sind, zu

unterscheiden. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass die Spaltung des aromatischen Ringes durch Abspaltung der Propionsäureseitenkette eingeleitet wurde. Als Produkte dieser Abspaltung resultierten Toluol, Phenol und Benzoesäure. Für die Aromatenspaltung wurde die reduktive Ringspaltung nach Evans (28) angenommen.

Neben Grbić-Galić (37) haben sich auch Tschech und Schink (96, 97) eingehend mit dem Abbau von hydroxylierten Mono-, Di- und Trihydroxybenzoesäuren befasst. Sie konnten zeigen, dass der Aromat von monohydroxylierten Benzoesäuren, je nach Position der Hydroxygruppe, nach verschiedenen Abbauebenen geöffnet wird. Eine auf 3-Hydroxybenzoesäure angereicherte methanogene Mischkultur kann auch Benzoesäure abbauen. Die meta-Position der Hydroxygruppe von 3-Hydroxybenzoesäure ist für die Ringspaltung ungünstig. Man vermutet deshalb, dass das Substrat durch eine Dehydroxylierung zuerst in Benzoesäure umgewandelt wird und danach eine Hydroxylierung in ortho-Position stattfindet, sodass eine Ringöffnung möglich wird. Dies wird durch die Fähigkeit, auch Benzoesäure abzubauen, erhärtet. Werden die Methanogenen durch BESA gehemmt, so wird Benzoesäure produziert, aber nicht weiter abgebaut. Die Methanogenen haben die wichtige Aufgabe, den durch den Abbau des Aromaten freigesetzten Wasserstoff aus der Kulturflüssigkeit zu entfernen.

Für den Abbau von 2-Hydroxybenzoesäure postulierten Tschech und Schink (96) einen ähnlichen Weg. Die Hydroxygruppe in ortho-Position befindet sich in einer günstigen Stelle für eine Ringöffnung, sodass für den ringspaltenden Organismus die ersten Abbauschritte wegfallen.

Die Fermentation von 4-Hydroxybenzoesäure zeigt dagegen einen andern Verlauf, obwohl die Hydroxygruppe in para-Position ebenfalls günstig liegt für einen Abbau über Benzoesäure. Nach Einführung einer weiteren Hydroxygruppe an Position 2 müsste die Ringspaltung über die erwähnten Schritte ablaufen.

Die von Tschech und Schink (96) isolierten Organismen decarboxylieren 4-Hydroxybenzoesäure zu Phenol. Da die Kultur auch Phenol abbaut, ist anzunehmen, dass der Ringaufschluss über Phenol eingeleitet wird.

Der Abbau von dihydroxylierten Verbindungen wie 2,4-Dihydroxybenzoesäure oder 2,6-Dihydroxybenzoesäure verläuft nach ähnlichem Muster. Zu Beginn findet eine Decarboxylierung zu Resorcinol (1,3-Dihydroxybenzol) statt, das über den reduktiven Abbaueweg gespalten werden kann. Als Produkte entstehen dabei Acetat und Butyrat im Verhältnis 4/1. Durch die Bildung von Butyrat können zusätzliche Reduktionsäquivalente auf das Fermentationsprodukt übertragen werden, da die durchschnittliche Oxidationszahl des Kohlenstoffs in Butyrat tiefer ist als in Acetat. Die ringspaltenden Bakterien scheiden somit keinen Wasserstoff aus.



Wasserstoffverwertende Begleitorganismen sind nicht nötig. Trotzdem konnten die Bakterien bisher nicht als Reinkultur, sondern nur in Anwesenheit einer *Campylobacter* sp., gezogen werden. Die Beziehung zwischen dem Aromatenspalter und diesem *Campylobacter* ist aber unbekannt. Auch 3,5-Dihydroxybenzoesäure wird durch eine Mischkultur abgebaut. Der Abbauweg ist unbekannt. Weder das decarboxylierte Derivat Resorcinol noch das dehydroxylierte Derivat Benzoesäure können in der Kulturflüssigkeit nachgewiesen werden. Werden diese beiden Substanzen der Kultur zugegeben, so findet kein Abbau statt.

Dagegen konnten Mikroorganismen in Reinkultur isoliert werden, die Trihydroxybenzoesäuren, z.B. Gallussäure zu Acetat und Kohlendioxid abbauen (78). Gallussäure wird dabei zu Pyrogallol decarboxyliert, welches durch eine para-Transhydroxylierung zu Phloroglucinol umgewandelt wird. Beim Phloroglucinol stehen die Hydroxygruppen metaständig und somit günstig für eine Ringspaltung nach dem Muster der reduktiven Ringöffnung. Als Produkte entstehen in einer Homoacetatgärung drei Mole Acetat und ein Mol Kohlendioxid. Bei dieser Fermentation brauchen keine überschüssigen Reduktionsäquivalente als Wasserstoff freigesetzt zu werden. Es ist daher nicht überraschend, dass Organismen, die nur trihydroxylierte Aromaten fermentieren, wie *Pelobacter acidigallici*, *Streptococcus bovis* und *Coprococcus* sp., als Reinkulturen isoliert werden konnten.

Kürzlich haben Krumholz und Bryant (58) ein *Eubacterium oxidoreducens* isoliert, das in Gegenwart von Wasserstoff oder Formiat Phloroglucinol, Pyrogallol und Gallussäure zu Acetat, Butyrat und Kohlendioxid abbauen kann. Die Verwertung von Wasserstoff oder Formiat für den Katabolismus unter Bildung von Acetat und Butyrat unterscheidet diese Mikroorganismen von den übrigen trihydroxybenzoesäureabbauenden Mikroorganismen. Die von Tsai und Jones (93), von Tsai et al. (94) und von Schink und Pfennig (78) beschriebenen Bakterien benötigen weder Wasserstoff noch Formiat und produzieren Acetat als alleiniges Endprodukt.

4. Merkmale des C_1 -Stoffwechsels

Zur detaillierten Abklärung des Abbaufweges der Syringasäure isolierten wir die einzelnen Populationen mittels der Agarschüttelkultur-Technik aus der Mischkultur. Der demethylierende Organismus der Bakteriengemeinschaft wurde auf Methanol gezogen. Wie bei *Acetobacterium woodii*, das ebenfalls auf methoxylierten Aromaten wächst (1), sind auch bei unserem Isolat Methoxygruppen von Aromaten und Methanol äquivalente Substrate. Sowohl die Zunahme der optischen Dichte wie auch die produzierte Acetatmenge sind unabhängig davon, ob *Acetobacterium woodii* auf Methoxygruppen von Aromaten oder auf Methanol wächst.

Es zeigte sich, dass der Organismus Methanol über eine Homoacetatfermentation abbaut, wobei gleichzeitig eine Kohlendioxidfixierung stattfindet. *Acetobacterium woodii* ist damit ein Bakterium, das auf C_1 -Substraten als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen kann.

Der C_1 -Stoffwechsel ist in den letzten 15 Jahren intensiv untersucht worden. Sowohl aerobe als auch anaerobe Bakterien sind fähig, C_1 -Substrate zu verwerten (121). Ich werde im folgenden nur soweit auf den aeroben Metabolismus dieser C_1 -Komponenten eingehen, als dies zum Verständnis des C_1 -Stoffwechsels des isolierten Bakteriums wichtig ist.

Bildung und Verbrauch von C_1 -Metaboliten durch anaerobe Bakterien sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst. Sowohl homoacetogene- als auch heteroacetogene *Clostridien* produzieren Formiat (91). Über die Bildung von Kohlenmonoxid durch anaerobe Mikroorganismen ist bis heute wenig bekannt. *Streptococcus mitis*, ein Acidogener, produziert Kohlenmonoxid beim Hämabbau in Anwesenheit von Luft (36). Bei *Butyrubacterium methylophilum* kann eine ^{14}CO -Produktion aus $^{14}CO_2$ durch Isotopenaustausch während des Wachstums auf Kohlenmonoxid als einziger Kohlenstoffquelle beobachtet werden (63). Methanol ist ein reduziertes Endprodukt, das beim Pektinabbau durch *Clostridien* entsteht (77). Es ist erstaunlich, dass alle aeroben, fakultativ- und strikt anaeroben pektinabbauenden Bakterien Methanol via Pektinmethylesterase produzieren, aber unfähig sind, Methanol zu assimilieren. *Escherichia coli* produziert Methanol durch eine Proteinmethylesterase. Methanthiol wird durch Demethylierung von Methionin im anaeroben Abbau von Proteinen und Glycoproteinen produziert (81). Methylamine sind Zwischenprodukte, die bei der Fermentation von Trimethylamin durch *Methanosarcina barkeri* entstehen (43). In der Natur entsteht Trimethylamin beim Abbau von Derivaten pflanzlichen Ursprungs, z.B. von Cholin. Methan wird von allen Methanogenen produziert. Auch *Desulfovibrio* ist fähig, sehr geringe Mengen von Methan zu produzieren (40). Das Methan entsteht aus dem C_3 -Atom von Pyruvat durch eine Methylreduktion. Bei den Methanbakterien findet eine Carboxylierreduktion statt.

Tabelle 1: Produktion von C₁-Kohlenstoffmetaboliten durch Anaerobier (nach Zeikus (121)):

C ₁ -Produkt	Organismus	Biochemische Transformation	Referenz
Formiat	<i>Clostridium</i> sp.	Kohlendioxidreduktase	91
		Pyruvat Formiat Lyase	90
	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Pyruvat Formiat Lyase	49
	<i>Streptococcus</i> sp.	Pyruvat Formiat Lyase	61
Kohlenmonoxid	<i>Streptococcus mitis</i>	Hämabbau (aerob)	26
	<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	Kohlendioxid Kohlenmonoxid Austausch	63
	<i>Methanobacterium</i> sp.	Kohlendioxid-Reduktion	115
Methanol	<i>Clostridium</i> sp.	Pektin Methylesterase	77
	<i>Acetobacterium woodii</i>	Demethylierung von methoxylierten Aromaten	1
	<i>Escherichia coli</i>	Protein Methylesterase	92
Methanthiol	<i>Clostridium sporogenes</i>	Methionin Demethylierung	81
	<i>Desulfovibrio</i> sp.	Unbekannt	40
Methylamine	<i>Methanosarcina barkeri</i>	Trimethylamin Spaltung	43
Methan	<i>Methanobacterium</i> sp.	Methyl-Coenzym M Reduktase	113
	<i>Methanosarcina barkeri</i>	Methyl-Coenzym M Reduktase	113
	<i>Clostridium pasteurianum</i>	Pyruvat Spaltung	73
	<i>Desulfovibrio</i> spp.	Pyruvat Spaltung	40

Einige C₁-Substrate verwertende anaerobe Bakterien sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die meisten C₁-Verwerter, besonders die Methanogenen, sind fähig, auf Wasserstoff und Kohlendioxid als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle zu wachsen (23, 121). Ein grosser Teil des Wasserstoffs dient der Energiegewinnung und reduziert Kohlendioxid zu Methan. Nur ein kleiner Teil wird assimiliert und in Biomasse eingebaut. Bei den Acetogenen

ist Wachstum auf Wasserstoff und Kohlendioxid ebenfalls weit verbreitet (*Clostridium* sp., *Acetobacterium woodii*) (121). Bei Homoacetatgärung von Glucose werden neben Acetat auch Wasserstoff und Kohlendioxid als Zwischenprodukte freigesetzt.

Tabelle 2: Verbrauch von C₁-Komponenten durch anaerobe Bakterien (Nach Zeikus (121)):

C ₁ -Substrat	Organismus	Referenz
Kohlendioxid/Wasserstoff	<i>Methanobacterium</i> sp.	23
	<i>Clostridium thermoautotrophicum</i>	112
	<i>Desulfotomaculum desulfuricans</i>	11
Kohlendioxid	<i>Methanosarcina barkeri</i>	55
	<i>Rhodopseudomonas capsulatus</i>	99
Formiat	<i>Methanococcus vanniellii</i>	48
	<i>Acetobacterium woodii</i>	4
Methanol	<i>Methanosarcina barkeri</i>	108
	<i>Desulfotomaculum orientis</i>	diese
	Stamm Zürich	Arbeit
Methylamin	<i>Methanosarcina barkeri</i>	108
Methoxygruppen an Aromaten	<i>Desulfotomaculum orientis</i>	diese
	Stamm Zürich	Arbeit

Homoacetatgärer haben die Fähigkeit, Kohlendioxid mit Hilfe des freigesetzten Wasserstoffs zu Acetat zu reduzieren (114). Sulfatreduzenten (*Desulfovibrio vulgaris*) (2) und photosynthetische Bakterien (*Rhodopseudomonas* sp.) (75) können ebenfalls Wasserstoff und Kohlendioxid als Substrate verwerten. *Pelobacter propionicus* fixiert Kohlendioxid durch Kondensation an höhere Alkohole (Äthanol, Propanol, Butanol) und Acetoin (79). Kohlenmonoxid wird von Methanogenen zur Methanproduktion und auch zum Einbau in Acetyl-Coenzym A ohne vorherige Oxidation zu Kohlendioxid direkt verwertet (99).

Wachstum auf Kohlenmonoxid und Wasserstoff ist für Homoacetogene schwieriger als auf Kohlendioxid und Wasserstoff. *Clostridium thermoautotrophicum* nutzt Kohlenmonoxid erst nach langer Adaptationszeit (121).

Rhodopseudomonas capsulata verwertet im Dunkeln Kohlenmonoxid als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator für das Wachstum (99).

Formiat dient vielen verschiedenen Bakterien als Substrat. Formiat wird in Gegenwart von Formiatdehydrogenase oft zu Kohlendioxid dehydriert. Der Energieaufwand ist praktisch derselbe, ob Formiat oder Kohlendioxid und Wasserstoff assimiliert wird. Auf Formaldehyd konnten bis jetzt weder Acetogene noch Methanogene gezüchtet werden. Formaldehyd wird aber von Escalante-Semerena und Wolfe (27) als zentrales Zwischenprodukt in der Methanogenese postuliert. Tetrahydromethanopterin reagiert spontan mit Formaldehyd zu Methenyltetrahydromethanopterin und ist damit Substrat für die Methanogenese, kann aber auch zur Synthese von Acetyl-Coenzym A weiterverwendet werden (44).

Methanol wird von Acetogenen (*Acetobacterium woodii*, *Clostridium thermoautotrophicum*), Methanogenen (*Methanosarcina* spp.), Sulfatreduzenten (*Desulfotomaculum* spp.) und photosynthetischen Bakterien (*Rhodopseudomonas* spp.) als Kohlenstoff- und Energiequelle benutzt. An *Methanosarcina barkeri* konnte gezeigt werden, dass Methanol auf Coenzym M übertragen wird und so direkt für die Methanogenese verwendet werden kann (101). Es wird vermutet, dass am ersten Schritt der Methanolassimilation in methanogenen- und acetogenen Methylo trophen ähnliche Enzyme beteiligt sind (102).

Über die anaerobe Oxidation und Assimilation von Methan ist wenig bekannt. Unter hohen Methandrucke n können gewisse Methanbakterien Methan zu Kohlendioxid oxidieren (117). Der Weg der Methanoxidation ist nicht die Umkehrung der Methanproduktion (117). Eine Verwendung von Methan durch Acetogene ist bisher nicht beschrieben worden. In Gegenwart von Acetat und Methan als Kohlenstoff- und Energiequelle und Sulfat als Elektronenakzeptor werden Methanoxidierer angereichert. Acetat wird dabei zu Zellmasse assimiliert und Methan zu Kohlendioxid oxidiert (69).

Methylamine können von Methanogenen ebenfalls verwertet werden. Die Methylgruppen dieser Verbindungen werden als Ganzes abgespalten und zu Methan reduziert. (Die Methylgruppen dieser Substrate können biochemisch mit der Methylgruppe von Acetat verglichen werden). Acetogene und sulfidogene Bakterien, die Methylamine verwerten, sind bis jetzt nicht bekannt.

Einige C₁-Verwerter können methoxylierte Aromaten in die korrespondierenden Hydroxyderivate, z.B. methoxylierte Phenole in Dihydroxybenzole umwandeln (9). *Acetobacterium woodii* demethyliert Benzoe- und Zimtsäure und bildet die entsprechenden Hydroxyderivate (1). Energetisch sind die Methoxygruppen am Aromaten mit Methanol zu vergleichen und die abgespaltenen Methylgruppen werden vermutlich wie Methanol assimiliert. Dabei entsteht kein freies Methanol, sondern die Methylgruppe wird durch direkten Methylgruppentransfer auf ein Corrinoid-Coenzym übertragen (95).

5. Fixierungs- und Stoffwechselwege von C_1 -Verwertern

In der Literatur werden drei verschiedene Fixierungswege von C_1 -Komponenten beschrieben (Figur 1):

1. Corrinoid-Weg
2. Glycin-Decarboxylase-Weg
3. Acetyl-Coenzym A-Weg

Der Corrinoidweg ist von Ljungdahl und Wood 1982 (62) an *Clostridium thermoautotrophicum*, die auf Hexosen und nicht auf C_1 -Substraten gewachsen waren, erarbeitet worden. Seit langem ist bekannt, dass in Gegenwart von $^{13}CO_2$ ein Teil des synthetisierten Acetats ^{13}C markierten Kohlenstoff enthält.

Bei Gärung entstehen aus Glucose Pyruvat, daraus resultieren Acetat und Kohlendioxid. Kohlendioxid wird dann ähnlich wie bei Methanogenen zu Formiat, Formyltetrahydrofolsäure, Methenyltetrahydrofolsäure, Methylen-tetrahydrofolsäure und Methyltetrahydrofolsäure reduziert. Dann erfolgt eine Transmethylierung von Methyltetrahydrofolsäure zu einem Methyl-enzymkomplex und die Acetatbildung durch die Carboxylierung mit einem zweiten Kohlendioxid.

Acetogene Bakterien, die Acetat ausschliesslich aus Kohlendioxid synthetisieren, besitzen Tetrahydrofolat (THF), ein Corrinoidenzym und als zentralen Enzymkomplex die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (71).

Anstelle von Kohlendioxid kann *Clostridium thermoaceticum* auch Kohlenmonoxid assimilieren (21). Dieses wird in Gegenwart von Pyruvat zu Kohlendioxid oxidiert und stimuliert die Kohlendioxidreduktion zu Acetat. *Clostridium aciurici* und *Clostridium cylindrosporium* haben im Gegensatz zu andern Clostridien die Möglichkeit der Acetatsynthese durch den Corrinoidweg nicht und können Kohlenmonoxid nicht oxidieren (21).

Der Glycin-Decarboxylaseweg ist eine andere Möglichkeit, wie Acetogene Acetat aus Kohlendioxid synthetisieren können (Figur 1). Die Reduktion von Kohlendioxid zu Methylentetrahydrofolsäure unterscheidet sich nicht vom Corrinoidweg. Die erste Reaktion, die vom Corrinoidweg abweicht, ist die Synthese von Glycin durch die Glycin-Decarboxylase.

Methanbakterien fixieren Kohlendioxid über den Acetyl-Coenzym A Weg. Dieser ist dem Corrinoidweg der Acetatsynthese von Acetogenen sehr ähnlich. Im Unterschied binden die Methanogenen die reduzierten Zwischenprodukte von der Formyl- bis zur Methylstufe nicht an Folate, sondern an Pteridine (Tetrahydromethanopterin, THMP). Diese beiden Träger sind aber strukturell, physiologisch und biochemisch verwandt (34, 104).

Die Synthese von Acetyl-Coenzym A als Vorstufe von verschiedenen Zellkomponenten aus Kohlendioxid weist folgende Merkmale auf:

Die Methylgruppe des Acetats entsteht durch eine Fixierung von Kohlendioxid an einen bis jetzt unbekannten Kohlenstoffcarrier. Dieses wird via Formyl, Methenyl, Methylen zu Methyl, schliesslich gebunden an Methyl-Coenzym M, reduziert. Die Carboxylgruppe entsteht durch Reduktion von Kohlendioxid zu Kohlenmonoxid. Die Methyl- und die Carboxylgruppe werden durch Transmethylierung und Transcarboxylierung zu Acetyl-Coenzym A kondensiert, woraus schliesslich Acetat entsteht. Auch an dieser Kondensierung und der Übertragung der Methylgruppe ist ein Corrinoidenzym beteiligt (74).

Die Synthese von Zellbestandteilen ist mit der Methanogenese gekoppelt, d.h. methylotherme und acetotrophe Kohlenstoffassimilation haben zu Beginn gemeinsame C_1 -Träger (53).

Über den C_1 -Metabolismus von Sulfidogenen ist bis heute wenig bekannt.

Jansen et al. (47) beschrieben ein *Desulfovibrio baarsii*, das fähig ist, auf Formiat und Kohlendioxid als einzigen Kohlenstoffquellen und mit Sulfat als Elektronenakzeptor zu wachsen. Dazu wird der gleiche Weg für die Fixierung von Kohlendioxid oder Formiat wie für die acetogenen- und methanogenen Bakterien postuliert.

6. Allgemeines zu den Methanbakterien

Methanogene sind bis auf wenige Ausnahmen chemolithotrophe, anaerobe Bakterien. Das für das Wachstum nötige, tiefe Redoxpotential verlangt strikte Anaerobiose. Reduktion von Nitrat, Nitrit oder Sulfat kann nicht nachgewiesen werden. Physiologisch weisen Methanbakterien einige Besonderheiten auf, die sie von den Eubakterien unterscheiden. Sie werden zusammen mit den extrem salzliebenden Halobakterien und acidophilen Sulfolobusarten zur Gruppe der Archaeobakterien gezählt (31, 32).

Eine Besonderheit der Methanogenen ist ihr eng begrenztes Substratspektrum. Als Substrate dienen Wasserstoff mit C_1 -Substraten wie Kohlenmonoxid, Kohlendioxid, Formiat, Methanol und Methylamine. Einige benutzen Acetat als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle, andere brauchen zusätzlich Wasserstoff. Als Produkt entsteht stets Methan. Als Stickstoffquelle dienen Ammoniumsalze (11, 52), seltener auch elementarer Stickstoff. Morphologisch sind Methanogene vielfältig, es können Coccen, Stäbchen, Sarcina-artige, Spirillen, und Pakete mit mehreren Zellen beobachtet werden.

In der Zellwand von Methanbakterien findet man weder D-Aminosäuren noch Muraminsäure. Das Fehlen von D-Aminosäuren hat zur Folge, dass

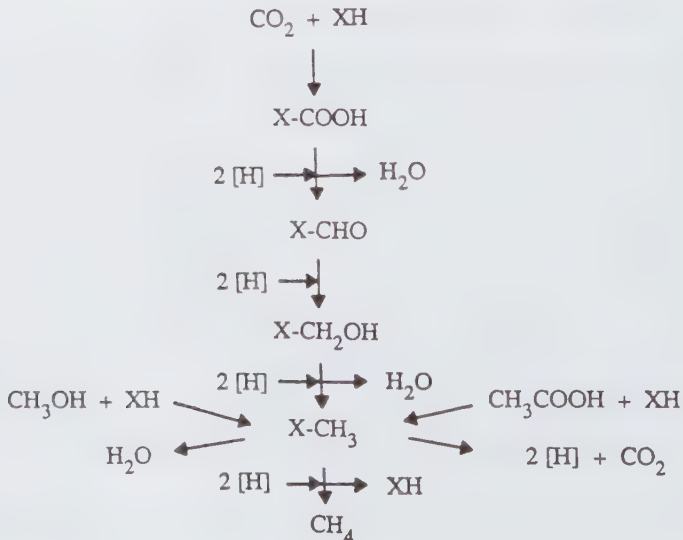
Methanogene resistent sind gegen Antibiotika, die mit D-Aminosäuren interferieren (57), wie auch gegen Lysozym. N-Acetylmuraminsäure ist durch N-Acetylalosaminuronsäure (Pseudomurein) oder andere Komponenten, wie Proteine oder Heteropolysaccharide, ersetzt.

Die Membranlipide bestehen aus Phytanyläther, Squalen und Hydrosqualen. Die Phytanyläther kommen sowohl als Phytanylglycerindiäther wie auch als Biphtanyldiglycerintetraäther vor.

Die Struktur der 16 S rRNS ist bei Archaeobakterien deutlich verschieden von den Eubakterien. Hinsichtlich Grösse und Basenzusammensetzung bestehen ebenfalls grosse Unterschiede. Die tRNS ist in einem Seitenarm verschieden von der sonst bei Bakterien üblichen Zusammensetzung. Das Genom ist relativ klein, die DNS hat etwa einen Drittel der Länge des *Escherichia coli* Genoms.

Die Komponenten des Elektronentransportes unterscheiden sich stark von denjenigen der Eubakterien, Mitochondrien und Chloroplasten. Chinone sind in Methanogenen nie nachgewiesen worden. Cytochrome konnten in *Methanosarcina* Stamm Fusaro gezeigt werden (59). Die Funktion im methanogenen Metabolismus ist unbekannt.

Figur 2: Hypothese der Methanfreisetzung nach Barker (5, 6).



Schon 1956 postulierte Barker (5, 6) eine lineare Reaktionskette von Kohlendioxid zu Methan, bei der die Zwischenprodukte an Träger gebunden sind (Figur 2). Dieser von Barker vorgeschlagene Weg der Methanbildung dient heute als nützliches Modell, da die experimentellen Befunde gut mit dem postulierten Reaktionsweg übereinstimmen.

Kohlendioxid ist nach Barker an einen unbekannten Träger X gebunden. Seit 1956 wurden verschiedene Cofaktoren gefunden, welche in der Rolle von X an der Methanbildung beteiligt sind. Mercaptoäthansulfonsäure (Coenzym M) dient als Methylcarrier bei der Kohlendioxidreduktion. Der fluoreszierende Cofaktor F_{420} ist Elektronenüberträger auf $NADP^+$. In der oxidierten Form absorbiert F_{420} bei 420 nm und fluoresziert bei 470 nm. Dies erlaubt eine leichte Erkennung von Methanogenen im Epifluoreszenzmikroskop (22).

Neben F_{420} wurde auch eine bei 430 nm absorbierende Verbindung F_{430} gefunden (39). F_{430} ist ein Nickeltetrapyrrol und bildet die prosthetische Gruppe der Methylreduktase (72). F_{430} zeigt keine Fluoreszenz. Methanopterin (F_{342}) dient als CO_2 -Carrier auf der Formylstufe (103). Bei der Methanogenese aus Methanol wird die Methylgruppe des Substrates mit Hilfe eines Corrinoidenzyms auf Coenzym M übertragen. Auch bei den Acetogenen dürfte ein ähnlicher Mechanismus vorhanden sein. Die Methylgruppe, gebunden an Tetrahydrofuran, wird ebenfalls durch ein Corrinoidenzym auf die Kohlenmonoxiddehydrogenase übertragen. Bei der Methanogenese aus Acetat wird die Methylgruppe über Kohlenmonoxiddehydrogenase auf ein Corrinoidenzym übertragen und über Coenzym M als Methan freigesetzt (115).

Die Demethylierung von $CH_3Co M$ ist ein stark exergonischer Schritt bei der Reduktion von Kohlendioxid zu Methan, er dürfte für die bei der Methanbildung ablaufende ATP-Bildung verantwortlich sein.

Assimilation von C_1 -Komponenten durch Methanogene

Die Synthese von notwendigen Zellbestandteilen erfolgt soweit bekannt bei *Methanobacterium thermoautotrophicum* und *Methanosarcina barkeri* über Reaktionen des Tricarbonsäurezyklus (119). Dieser ist aber nicht vollständig vorhanden, d.h. die Methanbakterien können nicht aus beliebigen Substraten Biomasse synthetisieren. Zentral im Aufbaustoffwechsel steht Acetat. Dieses dient auch als Substrat für die Synthese von Lipiden. Durch weitere Kohlendioxidfixierungen entsteht Pyruvat, welches als Substrat für die Synthese von Aminosäuren oder Zuckern dient. Pyruvat selbst kann für die Zellkomponenten, die sich direkt aus Acetat ableiten, nicht als Ausgangssubstanz dienen.

Problemstellung

In den letzten Jahren stieg das Interesse am anaeroben Metabolismus von aromatischen Substanzen, da der Abbau dieser Moleküle eine wichtige Rolle im globalen Kohlenstoffkreislauf darstellt. Da der Weg der anaeroben Aromatenspaltung nach wie vor unbekannt ist, wurde in dieser Arbeit versucht, anhand des Syringasäureabbaus Grundlagen über den anaeroben Abbau dieser Substanzen zu gewinnen.

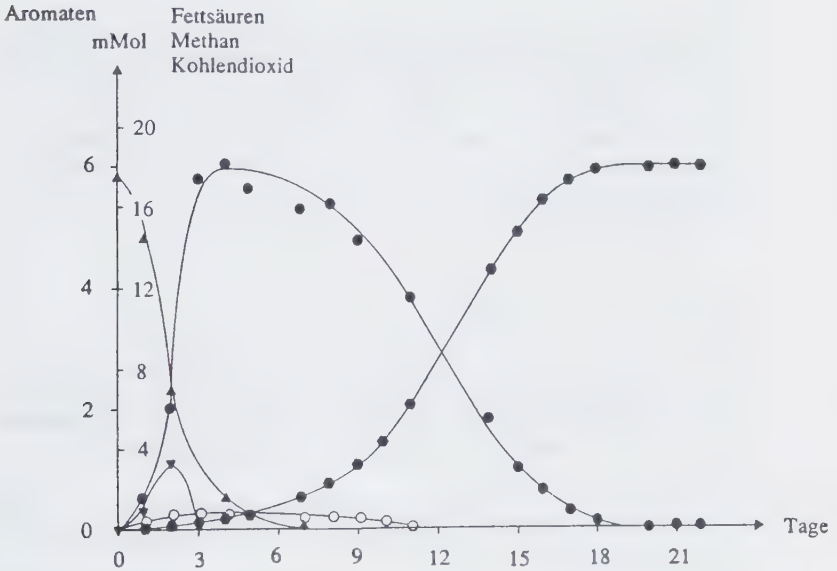
Aus der angereicherten syringasäureabbauenden Mischkultur wurden einzelne Bakterienpopulationen isoliert und als Reinkulturen charakterisiert. Im weiteren wurde untersucht, ob eine Zweiergemeinschaft von *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich und *Pelobacter acidigallici* fähig ist einen trimethoxylierten Aromaten wie 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure abzubauen.

Resultate

1. Abbauversuche mit der Mischkultur

Die aus dem Sediment des Zürichsees angereicherte Mischkultur bestand aus drei bis vier verschiedenen Organismen und hatte die Fähigkeit, Syringasäure vollkommen zu Methan und Kohlendioxid abzubauen (50). Durch fortgesetztes Überimpfen wurden die einzelnen Organismen dieser Gemeinschaft als Reinkulturen isoliert und physiologisch untersucht. Der Verlauf des Abbaus von Syringasäure durch die Mischkultur ist in Figur 3 dargestellt. 5.8 mMol Syringasäure wurden innert fünf Tagen vollständig abgebaut. Dabei entstand durch Abspaltung einer Methoxygruppe vorerst 3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzoesäure. Die Konzentration dieses Aromaten erreichte nach zwei Tagen ein Maximum. Gallussäure trat nicht in messbaren Konzentrationen auf. Ein ringspaltender Organismus in dieser Mischkultur war bei einer mit 10 % Inokulum angeimpften Kultur bereits so aktiv, dass es zu keiner Akkumulation von Gallussäure kam. Während des Abbaus dieses Aromaten wurden Butyrat und Acetat festgestellt. Die Acetatkonzentration erreichte nach drei Tagen ihr Maximum. Dieses Acetat wurde im Verlaufe der folgenden drei Tage wieder abgebaut. Daneben entstand auch Butyrat, allerdings in viel kleineren Mengen. Dieses erreichte nach vier Tagen die Maximalkonzentration und verschwand im Verlaufe der folgenden neun Tage wieder. Den Schluss der anaeroben Abbaukette übernahmen die acetatverwertenden Methanbakterien. Aus den eingesetzten 5.8 mMol Syringasäure wurden 18.0 mMol Methan und 2.82 mMol Biomasse als $< C_{3.9}H_{7.0}O_{1.7}N_{0.9} >$ gebildet.

Die eingesetzten 5.8 mMol Syringasäure wurden nach folgender Stöchiometrie zu Methan und Kohlendioxid abgebaut:



Figur 3: Abbau von Syringasäure durch eine angereicherte Mischkultur

- ▲ = Syringasäure
- ▼ = 3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzoesäure
- = Butyrat
- = Acetat
- = Methan, beziehungsweise Kohlendioxid (berechnet)

Der beschriebene Versuch ergab folgende Kohlenstoffbilanz:

Für die Bildung der 18.0 mMol Methan, respektive Kohlendioxid, waren 4.0 mMol Syringasäure notwendig und die Produktion von 2.82 mMol Biomasse als $\text{C}_{3.9}\text{H}_{7.0}\text{O}_{1.7}\text{N}_{0.9}$ erforderte 1.29 mMol Syringasäure (siehe Seite 69).

Durch die Probeentnahmen wurden insgesamt 3.78 mMol Kohlenstoff in Form von Syringasäure, 3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzoesäure, Butyrat und Acetat aus der Kulturflüssigkeit entfernt. Dies entspricht 0.42 mMol Syringasäure. Somit werden 98 % des eingesetzten Kohlenstoffs in den Produkten Methan, Kohlendioxid und Biomasse wieder gefunden.

Für den vollständigen Abbau dieser Syringasäure sind alle drei Organismen dieser Mischkultur notwendig, da die Einzelorganismen nur Teilschritte bewerkstelligen können. Der demethylierende Organismus (*Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich) wandelt den methoxylierten Aromaten in das korrespondierende Hydroxyderivat um, sodass dieser vom Aromatenspalter (*Pelobacter acidigallici*) zu Acetat gespalten werden kann. Das anfallende Acetat aus Demethylierung und Aromatenspaltung wird dann von einem Methanbakterium (*Methanococcus mazei*) disproportioniert.

2. Isolierung von drei Reinkulturen aus der Mischkultur

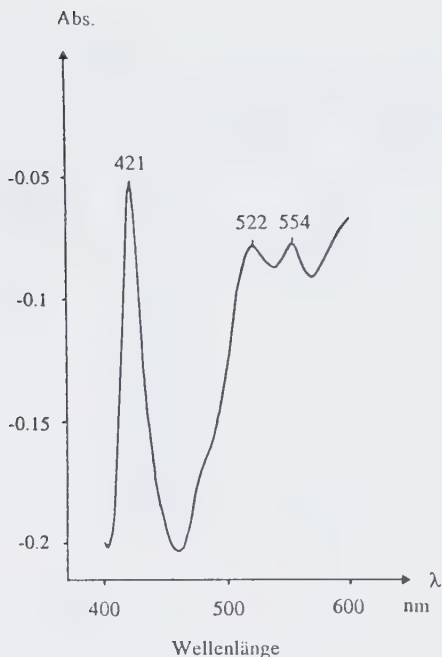
Aus der Syringasäure abbauenden Mischkultur, bestehend aus *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich (Demethylierer), *Pelobacter acidigallici* (Aromatenspalter) und *Methanococcus mazei* (acetotrophes Methanbakterium) wurden die einzelnen Arten isoliert und in Reinkultur genommen.

3. Charakterisierung des demethylierenden Organismus, *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich

Nach Campbell und Postgate (15) und Postgate (74) werden sporenbildende Bakterien, die Sulfat reduzieren können, zur Gattung *Desulfotomaculum* gezählt. Der von uns isolierte demethylierende Organismus muss nach diesen Kriterien der Gattung *Desulfotomaculum* zugeordnet werden.

Morphologische Beschreibung:

Es handelt sich um ein grampositives, nicht bewegliches, leicht gekrümmtes Stäbchen. Die Zellen weisen eine Länge von 5 µm und eine Breite von 1.5 µm auf. Der G+C-Gehalt beträgt 48 %. Differenzspektren (Figur 4, reduzierte gegen oxidierte Form) von Zellextrakten zeigen Absorptionsmaxima bei 421 nm, 522 nm und 554 nm, was auf das Vorkommen von Cytochromen schliessen lässt. Das Cytochrom konnte mit einem Aceton-HCl-Gemisch extrahiert werden, was auf ein b-Typ-Cytochrom hindeutet. Desulfovirdin konnte spektrophotometrisch nicht nachgewiesen werden.



Figur 4: Differenzspektrum aufgebrochener Zellen von *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich

Wachstumsbedingungen:

Das Wachstumsoptimum dieser Bakterien liegt bei 30° C, zwischen 17° C und 36° C ist Wachstum feststellbar. Das pH-Optimum liegt bei 7.0, zwischen pH 6.6 bis 8.4 ist Wachstum messbar. Kulturen grosser Zelldichte zeigen auch bei tieferen pH-Werten noch Wachstum. So kann beispielsweise der pH-Wert im Verlaufe des Substratabbaus und der Acetatbildung in der Kulturflüssigkeit bis auf 5.4 absinken, ohne dass eine Beeinträchtigung des Substratabbaus festgestellt werden kann.

Zusammensetzung der Phospholipide (Tabelle 3):

Die Lipidzusammensetzung kann taxonomisch wertvolle Aufschlüsse über Verwandtschaften zeigen. Dabei sind Methoxy-, Cyclopropyl-, ungesättigte oder Hydroxycyclopropyl-Fettsäuren als Marker für die Identifikation besonders charakteristisch.

Tabelle 3: Die Zusammensetzung von Fettsäuren und Hydroxyfettsäuren in lyophilisierten Zellen von *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich nach Wachstum unter fermentierenden Bedingungen.

Fettsäuren	% Anteil *	Hydroxyfettsäuren	% Anteil *
14:0	3,7	OH 16:0	2,3
i 15:0	0,2	1 a OH 15	14,7
a 15:0	0,2	i OH 17	13,8
15:0	0,7	2 OH 18	6,7
16:1 ω 10	7,4	2 OH 19:0	1,7
16:1 ω 7 c	14,8	OH 20	1,9
16:1 ω 7 t	1,3	br OH 21	1,3
16:1 ω 5	0,4	2 OH 21	53,7
16:0	29,1	3 OH 21	1,5
17:1 ω 9	0,1	3 OH 22	1,3
▽ 17:0 (9,10)	13,8	3 OH 23	1,2
17:0	0,2		
18:1 ω 9	1,0		
18:1 ω 7	1,5		
18:1 ω 7 t	0,2		
18:0	22,8		
▽ 19:0 (9,10)	0,7		
▽ 19:0 (11,12)	1,3		
18:2 ω 6	0,6		

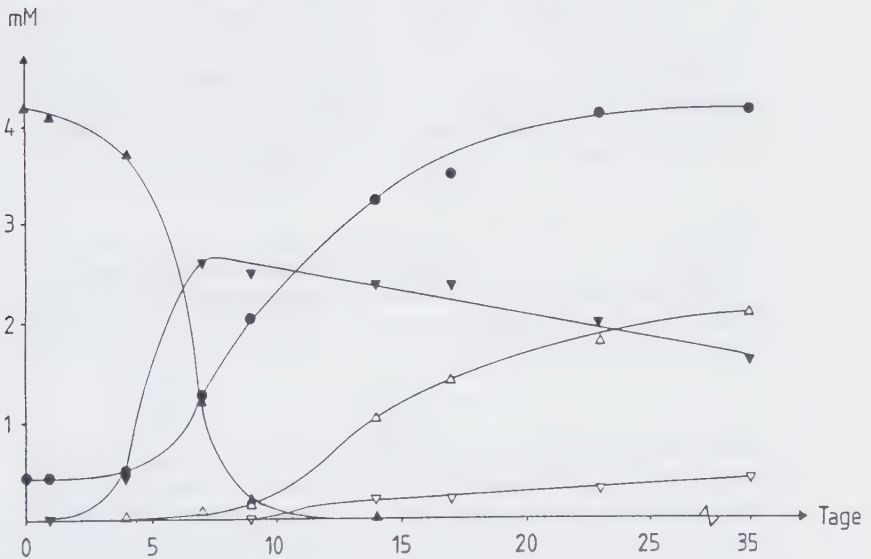
* = Die % Anteile beziehen sich auf die Menge der betreffenden Fettsäuren, respektive Hydroxyfettsäuren in den Phospholipiden

Bis jetzt sind erst wenige sulfatreduzierende Organismen auf ihre Lipidzusammensetzung untersucht worden, sodass das Lipidmuster wenig zur Charakterisierung dieses Bakteriums beiträgt. Für andere sulfatreduzierende Organismen sind in der Zwischenzeit einige spezifische Markerlipide gefunden worden. Taylor und Parkes (89) ordnen den unten aufgeführten Organismen folgende Markerlipide zu:

<i>Desulfovibrio</i> sp.	17:1 ω 7
<i>Desulfobacter</i> sp.	10 Me 16:0
<i>Desulfobulbus</i> sp.	17:1 ω 6

Abbau von Syringasäure durch *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich

Füttert man *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich aromatische Substanzen mit Methoxygruppen, so werden diese in ihre Hydroxyderivate umgewandelt (Figur 5). Der Aromat bleibt dabei intakt. Die Methoxygruppen werden zu Acetat fermentiert. Man vermutet, dass die Demethylierung von substituierten Aromaten sich innerhalb der Bakterienzelle abspielt, so dass kein Methanol in die Kulturflüssigkeit austritt. Die Eigenschaft, Phenylmethyläther zu spalten, ist bis heute nur von wenigen Organismen bekannt (1, 115).



Figur 5: Fermentierender Abbau von Syringasäure durch *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich

- ▲ = Syringasäure
- ▼ = 3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzoesäure
- △ = Gallussäure
- ▽ = Pyrogallol
- = Acetat

Syringasäure wird durch *Desulfotomaculum*-Batchkulturen nicht vollständig in das Hydroxyderivat Gallussäure umgewandelt, wie dies bei der Mischkultur der Fall ist. Das Zwischenprodukt 3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzoesäure häuft sich an. Die produzierte Gallussäure scheint einen hemmenden Einfluss auf die weitere Demethylierung von 3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzoesäure zu haben (Figur 5). In der Mischkultur hingegen wird die gebildete Gallussäure fortwährend durch den Aromatenspalter aus der Kulturflüssigkeit entfernt, sodass sich nie grössere Mengen akkumulieren können.

Versuche mit verschiedenen Konzentrationen an Syringasäure zeigen, dass die Demethylierung von 3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzoesäure nicht direkt von der Gallussäurekonzentration abhängig ist. Das Verhältnis Gallussäure/3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzoesäure beträgt jeweils 3/2, unabhängig von den Konzentrationen dieser beiden Substanzen. Wie man aus der Figur 5 entnehmen kann, vermag *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich einen Teil der akkumulierten Gallussäure zu Pyrogallol zu decarboxylieren. Die Decarboxylierungsreaktion ist aber nur schwach exergonisch (- 6,4 kJ/Mol) und aus dieser Umwandlung kann der Organismus energetisch wenig profitieren.

Ähnlich wie das von Bache und Pfennig (1) untersuchte *Acetobacterium woodii* hat auch das hier isolierte *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich die Fähigkeit, neben Methoxygruppen aromatischer Substanzen Methanol zu verwerten. Man kann deshalb für Methanol eine analoge Stöchiometrie aufstellen:



Im Versuch, der in Figur 5 dargestellt ist, entstanden aus 4.2 mMol Syringasäure 1.6 mMol 3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzoesäure, 2.1 mMol Gallussäure, 0.4 mMol Pyrogallol, sowie 3.8 mMol Acetat. Die Methoxygruppen des Substrates wurden zu Acetat oxidiert, wobei Kohlendioxid als Elektronenakzeptor diente. Es fand somit eine Kohlendioxidfixierung statt, was für Bakterien, die auf C₁-Substraten wachsen, nicht ungewöhnlich ist.

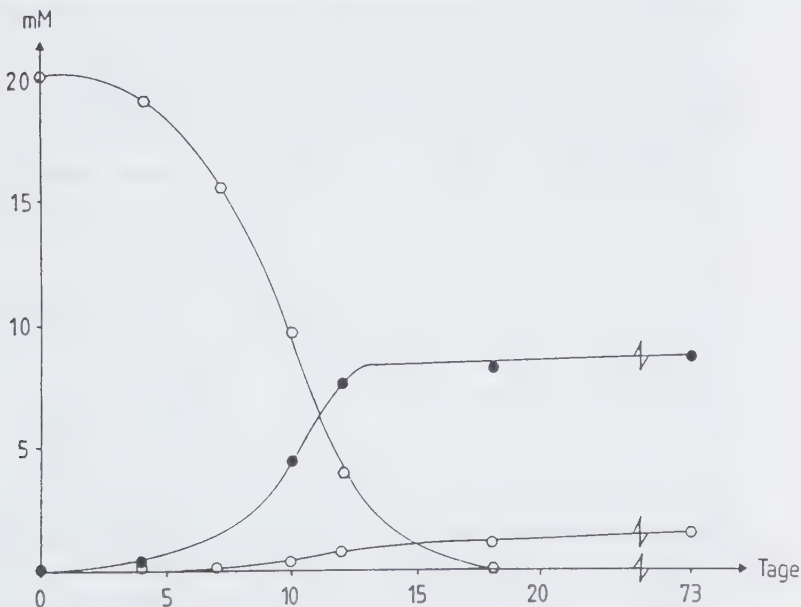
Nach 35 Tagen wurde eine Zunahme der optischen Dichte (OD₆₃₀) von 0.063 gemessen. Dies entspricht einer Biomassezunahme von 0.50 mMol. Dafür sind 1.38 mMol Methoxygruppen notwendig (siehe Seite 69).

Da 6.8 mMol Methoxygruppen abgebaut wurden, für die Bildung der 3.8 mMol Acetat und 0.5 mMol Biomasse aber nur 6.43 mMol notwendig sind, werden in den Produkten 95 % des eingesetzten Kohlenstoffs wiedergefunden.

Bei grösseren Konzentrationen an Methanol entsteht neben Acetat auch Butyrat als Endprodukt (Figur 6).



Der Versuch ergab, dass aus 20.1 mMol Methanol 8.7 mMol Acetat und 1.4 mMol Butyrat entstanden. Dazu sind 16.3 mMol Methanol nötig. Die Zunahme der optischen Dichte (OD_{630}) von 0.125 entspricht 0.99 mMol Biomasse. Dafür sind weitere 2.75 mMol Methanol notwendig (siehe Seite 69), für die Produktion von Acetat, Butyrat und Biomasse damit 19.05 mMol Methanol. Somit werden 95 % des eingesetzten Kohlenstoffs in den Produkten wieder gefunden.



Figur 6: Fermentativer Abbau von Methanol durch *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich

- = Methanol
- = Acetat
- = Butyrat

Sowohl bei der Umwandlung von Methanol in Acetat als auch bei der Fermentation zu Butyrat findet eine Kohlenstofffixierung statt. Die Bildung von Butyrat aus Methanol liefert dem Organismus pro umgewandeltes Methanol praktisch denselben Energiebetrag wie bei der Acetatbildung. (Methanolfermentation zu Acetat ergibt -55.4 kJ pro Mol fermentiertes Methanol, Methanolfermentation zu Butyrat ergibt -54.2 kJ pro Mol fermentiertes Methanol). Bei der Bildung von Butyrat können zusätzliche Reduktionsäquivalente ($[H]$, e^-) auf das Fermentationsprodukt übertragen werden, da die durchschnittliche Oxidationszahl des Kohlenstoffs im Butyrat tiefer ist als im Acetat.

Neben methoxylierten Aromaten und Methanol kann *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich auch Äthanol, n-Propanol, Laktat, Pyruvat, Formiat und Trimethylamin als Kohlenstoffquellen verwerten. Die Alkohole werden dabei in die korrespondierenden Säuren und Acetat umgewandelt. Aus Pyruvat, Laktat und Formiat entstehen Acetat, Butyrat und Kohlendioxid. Dabei zeigt sich ein ähnliches Verhalten wie beim Wachstum auf Methanol. Anfänglich entsteht ausschliesslich Acetat und erst im späteren Verlauf der Fermentation wird Butyrat gebildet.

Die Dissimilation von Laktat erfolgt nach folgenden Stöchiometrien:



und

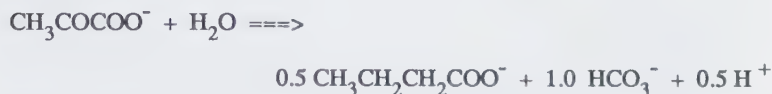


Beim Abbau von 28.0 mMol Laktat werden 37.1 mMol Acetat und 1.8 mMol Butyrat gebildet. Dafür werden 27.7 mMol Laktat benötigt. Die Zunahme der optischen Dichte (OD_{630}) beträgt 0.134, was einer Biomasseproduktion von 1.1 mMol entspricht. Dafür sind 1.5 mMol Laktat notwendig (siehe Seite 69). Somit werden 104 % des eingesetzten Substratkohlenstoffs in den Produkten gefunden.

Die Dissimilation von Pyruvat erfolgt nach folgenden Stöchiometrien:



und



Beim Abbau von 19.7 mMol Pyruvat werden 21.1 mMol Acetat und 0.5 mMol Butyrat gebildet. Dafür werden 17.9 mMol Pyruvat benötigt. Die Zunahme der optischen Dichte (OD_{630}) beträgt 0.204, was einer Biomasseproduktion von 1.6 mMol entspricht (siehe Seite 69). Somit werden 104 % des eingesetzten Substratkohlenstoffs in den Produkten gefunden.

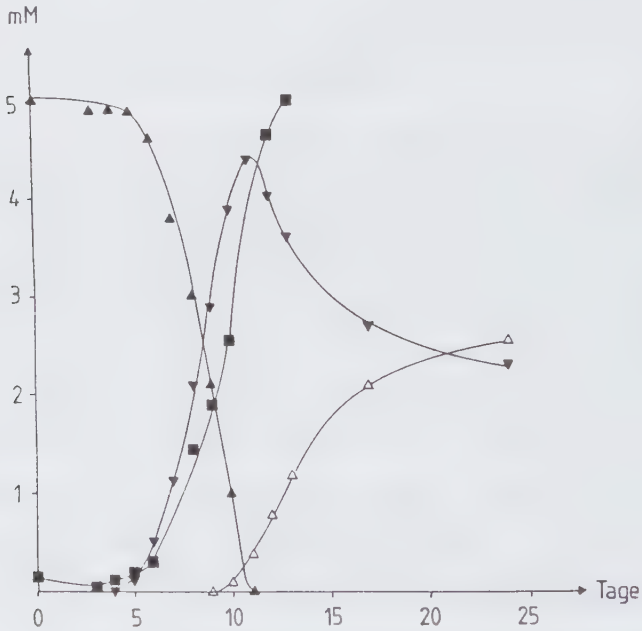
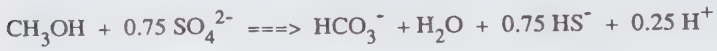
Die Produktion von Biomasse ist abhängig von der Energie, die der Organismus bei der Fermentation der betreffenden Substrate freisetzt. Für Methanol beträgt die Zunahme der optischen Dichte bei 630 nm 0.005 pro mMol fermentiertes Methanol.

Die Fermentation von Pyruvat zu Acetat ist energetisch günstiger als die Methanolfermentation (-73.3 kJ pro mMol fermentiertes Pyruvat), was sich in einer gesteigerten Biomassebildung niederschlägt.

Folgende Substanzen werden fermentativ nicht verwertet: Wasserstoff, Kohlenmonoxid, Acetat, Propionat, Butyrat, Isopropanol, Butanol, Aceton, 2,3-Butandiol, Succinat, Methoxyessigsäure, Anilin, N,N-Dimethylformamid, Methylamin, Dimethylsulfoxid, Dimethylsulfid, Dimethyldisulfid, Toluol, p-Kresol, Glucose und Fructose.

Im weiteren hat *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich auch die Fähigkeit, Methanol unter sulfatreduzierenden Bedingungen umzusetzen. Wachstum auf Methanol unter Sulfatreduktion ist 1985 erstmals von Klemps et al. (54) beschrieben worden. Bei dem von Klemps et al. isolierten *Desulfotomaculum* sp. handelt es sich um einen Organismus, der neben verschiedenen Fettsäuren (Propionat bis Palmitat) auch Methanol und Methoxygruppen von Trimethoxybenzoesäure für das Wachstum benutzt. Im sulfatfreien Medium zeigt *Desulfotomaculum orientis* ein langsames Wachstum auf Formiat, Methanol, Äthanol, Lactat, Pyruvat und Trimethoxybenzoesäure (54). *Desulfotomaculum orientis* zeigt unter fermentierenden Bedingungen eine Kohlendioxidreduktion und produziert Acetat, was auch für den von uns isolierten *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich zutrifft.

Die folgende Stöchiometrie gilt sowohl für Methoxygruppen von Aromaten als auch für Methanol:



Figur 7: Abbau von Syringasäure unter sulfatreduzierenden Bedingungen

- ▲ = Syringasäure
- ▼ = 3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzoessäure
- △ = Gallussäure
- = Sulfid

Im Gegensatz zum fermentierenden Abbau wird kein Acetat gebildet. Sämtliche Elektronen des Substrates werden auf den Sulfatschwefel übertragen.

Von den 5.0 mMol eingesetzter Syringasäure sind 2.3 mMol 3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzoesäure und 2.5 mMol Gallussäure, sowie 4.9 mMol Sulfid gebildet worden. Somit sind 7.3 mMol Methoxygruppen umgesetzt worden. Die Produktion von 4.9 mMol Sulfid benötigt 6.5 mMol Methoxygruppen. Die Zunahme der optischen Dichte (OD_{630}) beträgt 0.102, was einer Biomasseproduktion von 0.8 mMol entspricht. Dafür sind weitere 2.2 mMol Methoxygruppen notwendig (siehe Seite 69). In diesem Fall werden 119 % des als Methoxygruppen eingesetzten Kohlenstoffs in den Produkten gefunden. Beim fermentierenden Syringasäureabbau wird nur 0.073 mMol Biomasse pro umgesetzte Methoxygruppe gebildet.

Das freigesetzte Sulfid bildet mit den als Spurenelement eingesetzten Eisenionen schwarze Niederschläge. Aus diesem Grunde kann bei sulfatreduzierenden Kulturen die optische Dichte nur bedingt als Mass für die Biomasse verwendet werden.

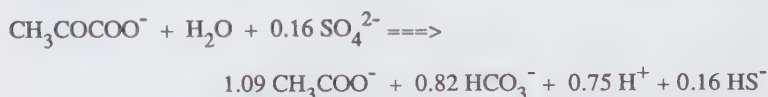
Im weiteren können neben methoxylierten Aromaten und Methanol auch Äthanol, Lactat, Pyruvat, Butanol, Formiat und Butyrat sowie Wasserstoff/Kohlendioxid unter Sulfatreduktion als Substrate dienen. Im Gegensatz zu Methanol werden aber diese Substrate nicht vollständig zu Kohlendioxid oxidiert, sondern man findet einen grossen Teil des Substratkohlenstoffs als Acetat wieder. *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich gehört infolgedessen zusammen mit *Desulfobulbus propionicus*, *Desulfomonas pigra*, zahlreichen *Desulfovibrio*-Arten und allen bis heute bekannten *Desulfotomaculum*-Arten zur Gruppe der Sulfatreduzenten, die ihre Substrate nur unvollständig oxidieren.

Für den Abbau von Laktat unter sulfatreduzierenden Bedingungen gilt folgende Stöchiometrie:



Beim Abbau von 27.0 mMol Laktat werden 27.0 mMol Acetat und 10.6 mMol Sulfid gebildet. Dafür werden 25.2 mMol Laktat benötigt. Die Zunahme der optischen Dichte (OD_{630}) beträgt 0.144, was einer Biomasseproduktion von 1.14 mMol entspricht. Dafür sind 1.56 mMol Laktat notwendig (siehe Seite 69). Somit werden 97 % des eingesetzten Laktats in den Produkten gefunden.

Für den Abbau von Pyruvat unter sulfatreduzierenden Bedingungen gilt folgende Stöchiometrie:

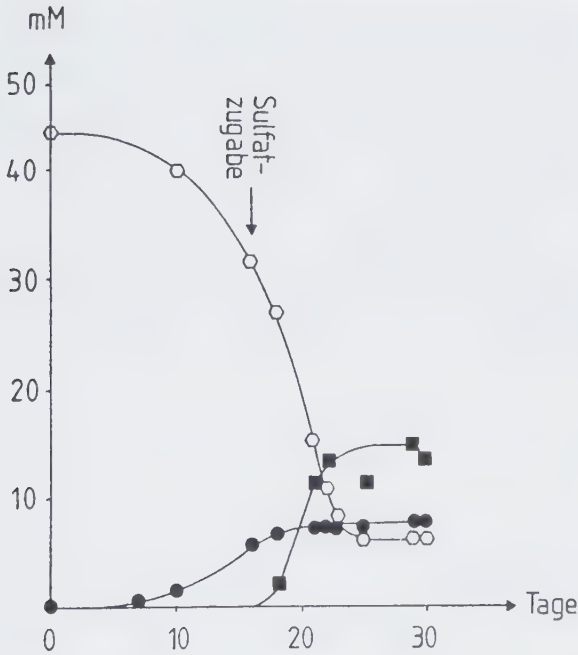


Beim Abbau von 18.3 mMol Pyruvat werden 14.9 mMol Acetat und 2.2 mMol Sulfid gebildet. Dafür werden 13.7 mMol Pyruvat benötigt. Die Zunahme der optischen Dichte (OD_{630}) beträgt 0.221, was einer Biomasseproduktion von 1.75 mMol entspricht. Dafür sind 2.9 mMol Pyruvat notwendig (siehe Seite 69). Somit werden 91 % des eingesetzten Pyruvats in den Produkten wiedergefunden.

4. Umstellung von Sulfatreduktion auf Fermentation, respektive Umstellung von Fermentation auf Sulfatreduktion durch *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich

Desulfotomaculum orientis Stamm Zürich kann ohne Verzögerung von der fermentierenden Lebensweise auf die Sulfatreduktion umstellen. Wie man aus Figur 8 entnehmen kann, ist die Umstellung nicht vollständig, es findet nur eine teilweise Verlagerung von der Fermentation zur Sulfatreduktion statt. So werden auch nach der Sulfatzugabe neben Sulfid auch noch 2.0 mMol Acetat gebildet.

Für die Produktion von 7.6 mMol Acetat während der ersten 16 Tage sind 10.1 mMol Methanol notwendig (siehe Seite 24). Bei der Annahme, dass pro mMol fermentiertes Methanol die optische Dichte (OD_{630}) um 0.005 zunehme, kann beim Abbau von 11.9 mMol Methanol eine Zunahme der optischen Dichte von 0.060 angenommen werden, was einer Biomassezunahme von 0.47 mMol entspricht. Dafür werden 1.31 mMol Methanol benötigt (siehe Seite 69). Somit konnten 96 % des eingesetzten Methanols in der ersten Abbauphase gefunden werden.



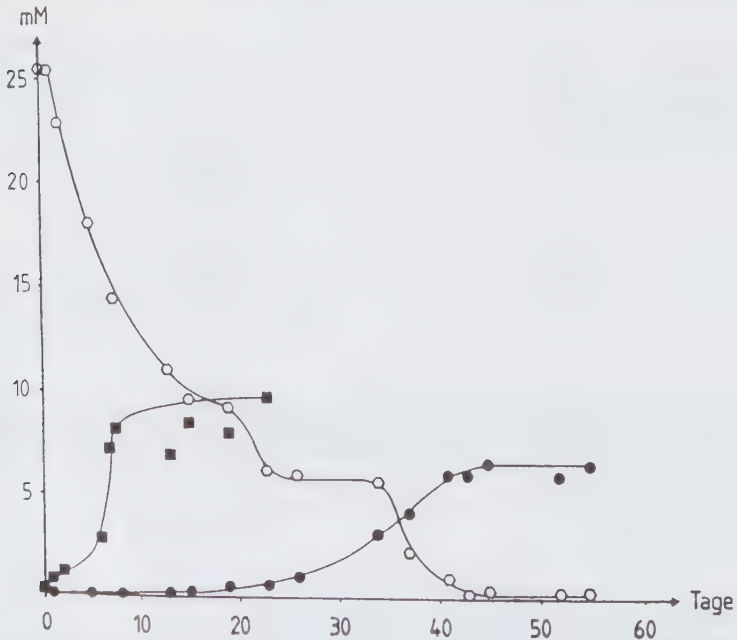
Figur 8: Umstellung vom fermentierenden zum sulfatreduzierenden Methanolabbau durch *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich

- = Methanol
- = Acetat
- = Sulfid

Die verbleibenden 25.3 mMol Methanol werden sulfatreduzierend abgebaut. Dabei werden 15.1 mMol Sulfid und 1.0 mMol Biomasse gebildet. Für die Produktion des Sulfids sind 20.1 mMol Methanol (siehe Seite 28), für jene der Biomasse 2.78 mMol Methanol notwendig (siehe Seite 69). Somit konnten 90 % des eingesetzten Methanols in der zweiten Abbauphase gefunden werden.

Für den gesamten Abbauprozess beträgt die Zunahme der optischen Dichte (OD_{630}) 0.156, was einer Biomasseproduktion von 1.23 mMol entspricht. Es werden 37.2 mMol Methanol umgesetzt. Für die Produktion von 7.6 mMol Acetat und 15.1 mMol Sulfid werden 30.27 mMol Methanol benötigt. Die Synthese von 1.23 mMol Biomasse erfordert 3.4 mMol Methanol (siehe Seite 69). Somit werden 90 % des eingesetzten Substratkohlenstoffs in den Produkten wieder gefunden.

Wird nur eine limitierte Menge an Sulfat vorgegeben, muss der Organismus nachdem das Sulfat aufgebraucht ist, von Sulfatreduktion auf Fermentation umstellen. Es vergehen dabei gut zehn Tage, bis die Umschaltung auf Kohlendioxidreduktion beginnt und Acetatbildung festgestellt werden kann (Figur 9).



Figur 9: Umstellung von Sulfatreduktion auf fermentierendes Wachstum

- = Methanol
- = Acetat
- = Sulfid

Für die Produktion von 7.8 mMol Sulfid im Zeitraum der ersten 8 Tage sind 10.4 mMol Methanol notwendig (siehe Seite 28). Beim Abbau von 11.1 mMol Methanol werden 0.44 mMol Biomasse gebildet. Dafür werden 1.22 mMol Methanol benötigt (siehe Seite 69). Somit konnten 105 % des eingesetzten Methanols in der ersten Abbauphase gefunden werden.

Die verbleibenden 14.1 mMol Methanol werden fermentativ abgebaut. Die Produktion von 6.2 mMol Acetat und 0.2 mMol Butyrat erfordert 8.9 mMol Methanol (siehe Seiten 24, 25). Daneben entstehen weitere 1.86 mMol Sulfid, dafür sind 2.48 mMol Methanol notwendig (siehe Seite 28).

Beim Abbau von 13.9 mMol Methanol werden 0.55 mMol Biomasse produziert. Dafür wären 1.53 mMol Methanol erforderlich (siehe Seite 69). Somit konnten 93 % des eingesetzten Methanols in der zweiten Abbauphase wieder gefunden werden.

Für den gesamten Abbauprozess beträgt die Zunahme der optischen Dichte (OD_{630}) 0.092, was einer Biomasseproduktion von 0.73 mMol gleich kommt.

Es werden 25.2 mMol Methanol umgesetzt. Für die Produktion von 6.2 mMol Acetat, 0.2 mMol Butyrat und 9.66 mMol Sulfid werden 21.9 mMol Methanol benötigt. Die Synthese von 0.73 mMol Biomasse erfordert 2.03 mMol Methanol. Somit werden 95 % des eingesetzten Substratkohlenstoffs in den Produkten gefunden.

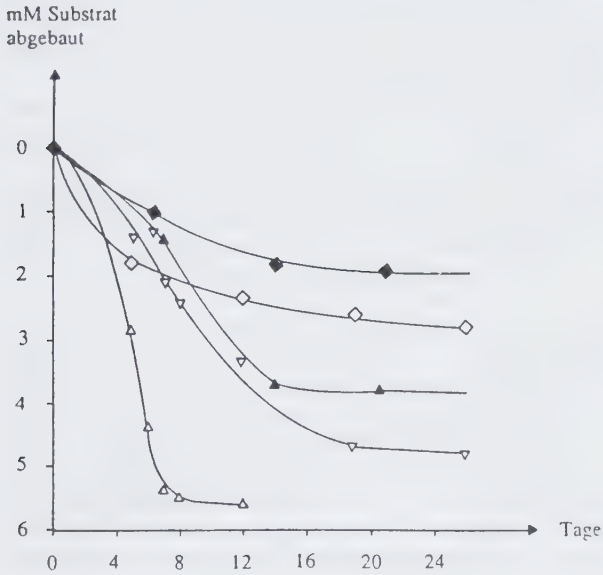
5. Charakterisierung des gallussäureabbauenden *Pelobacter acidigallici*

Der ringspaltende Organismus, der aus der Dreiergemeinschaft isoliert wurde, besitzt die Fähigkeit, aromatische Substanzen, die in bestimmter Position drei Hydroxygruppen aufweisen, in einer Homoacetatfermentation abzubauen. Als Substrate dienen Gallussäure, Pyrogallol, Phloroglucinol, 2,3,4-Trihydroxybenzoesäure und 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure. Aus einem Mol Hydroxybenzoesäure werden ein Mol Kohlendioxid und drei Mole Acetat gebildet, aus einem Mol Hydroxybenzol entstehen drei Mole Acetat. Bei dieser Fermentation werden keine überschüssigen Reduktionsäquivalente als Wasserstoff freigesetzt, sodass der ringspaltende Organismus nicht auf die Cocultur mit einem wasserstoffverwertenden Bakterium angewiesen ist.

Mittels der Technik der Agarschüttelkultur gelang es, den Aromatenspalter in Reinkultur zu bringen. Es handelt sich dabei um ein anaerobes, gramnegatives, nicht sporenbildendes Bakterium. Die kurzen, stäbchenförmigen Zellen haben eine Grösse von $0,5 \mu\text{m} \times 1 - 2 \mu\text{m}$. Sie kommen einzeln, zu zweit und manchmal als kurze Ketten vor. Zellen im exponentiellen Wachstum sind beweglich. Das Bakterium wächst fermentativ nur auf den oben erwähnten Substraten.

Die isolierten Bakterien sind mit dem von Schink und Pfennig isolierten *Pelobacter acidigallici* identisch (78). Aufgrund der Eigenschaften, obligat anaerob, gramnegativ und nicht sporenbildend, wird das Bakterium zur Familie der *Bacteroidaceae* gezählt. Die Gattung *Pelobacter* ist 1982 von Schink und Pfennig (78) eingeführt worden, da sich der neu isolierte aromatspaltende Organismus nicht in die bestehenden Gattungen dieser Familie einordnen liess. Das engbegrenzte Substratspektrum, das sich auf einen Abbau der erwähnten trihydroxylierten Aromaten beschränkt, ist unüblich für die bestehenden Gattungen dieser Familie.

Figur 10 zeigt, dass Gallussäure unter den fünf abbaubaren Aromaten am schnellsten metabolisiert wird. Der Abbau von Pyrogallol, Phloroglucinol, 2,3,4-Trihydroxybenzoesäure und 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure erfolgt bedeutend langsamer. Bei 2,3,4-Trihydroxybenzoesäure und 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure könnten eventuell sterische Effekte für den verzögerten Abbau dieser Substrate verantwortlich sein. So könnte beispielsweise die Carboxygruppe, die bei 2,3,4-Trihydroxybenzoesäure der Hydroxygruppe benachbart ist, einen schnellen Abbau dieser Substanz beeinträchtigen. Bei 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure ist die Carboxygruppe zwei Hydroxygruppen benachbart. Bei Gallussäure liegt die Carboxygruppe frei, sie ist nicht abgeschirmt von Hydroxygruppen. Falls der Abbau über Pyrogallol abläuft, könnte somit die freistehende Carboxygruppe der Gallussäure leichter abgespalten werden.



Figur 10: Abbau von 5 verschiedenen, trihydroxylierten Aromaten durch *Pelobacter acidigallici*

- △ = Gallussäure
- ▽ = Pyrogallol
- ▲ = Phloroglucinol
- ◇ = 2,3,4-Trihydroxybenzoessäure
- ◆ = 2,4,6-Trihydroxybenzoessäure

Der Mechanismus der Ringspaltung ist nach wie vor unbekannt. 1984 haben Samain et al. (76) als Abbauweg den bekannten reduktiven Ringspaltungsmechanismus von Evans auch für *Pelobacter acidigallici* postuliert (Figur 11).

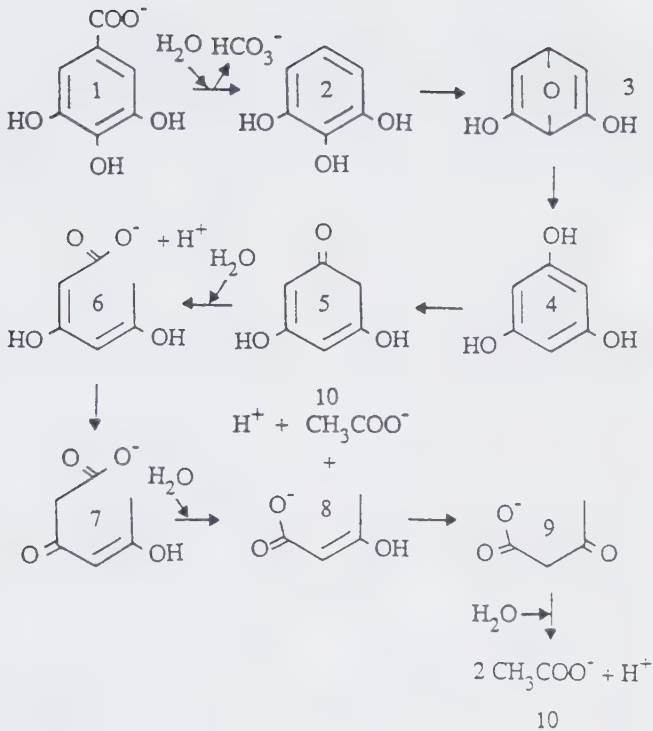
Gallussäure wird dabei in einem ersten Schritt zu Pyrogallol decarboxyliert. Auch Protocatechusäure wird decarboxyliert, als Produkte können Catechol und Kohlendioxid nachgewiesen werden.

Die Fermentation von Gallussäure führt vorübergehend zur Akkumulation von Pyrogallol und Phloroglucinol in der Kulturflüssigkeit. Die Bildung von Phloroglucinol kann durch eine para-Transhydroxylierung aus Pyrogallol erklärt werden. Diese Reaktion ist bereits für den aerob wachsenden Pilz *Fusarium solani* nachgewiesen worden (105).

Den weiteren Abbaupfad, d.h. die eigentliche Ringspaltung, haben Samain und seine Mitarbeiter durch Nachweis der entsprechenden Enzyme untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass der anaerobe Abbau von trihydroxylierten Aromaten durch eine Phloroglucinolreduktase eingeleitet wird. Ein zellfreier Extrakt dieser Bakterien katalysiert die Oxidation von NADPH in Anwesenheit von Phloroglucinol und das reduzierte Produkt, Dihydrophloroglucinol kann spektroskopisch nachgewiesen werden.

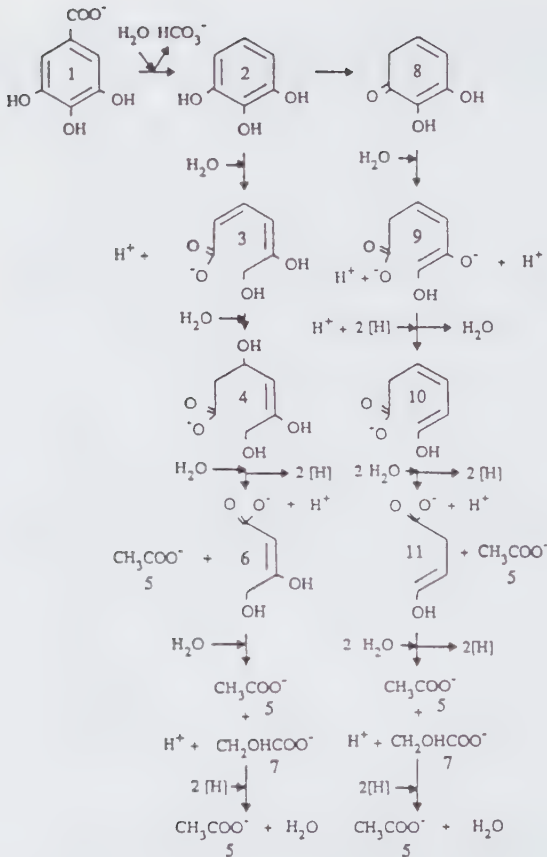
Gallussäure wird zuerst zu Pyrogallol decarboxyliert. Dann folgt eine para-Transhydroxylierung zu Phloroglucinol. In den weiteren Abbauschritten erfolgt die Ringspaltung nach dem Muster der β -Oxidation. Als Produkte entstehen pro Mol Gallussäure ein Mol Kohlendioxid und drei Mole Acetat. Ein weiterer hypothetischer Abbaupfad für die Gallussäure ist in Figur 12 skizziert. Gallussäure wird dabei zu Pyrogallol decarboxyliert, dann erfolgt direkt die Ringspaltung. Dazu muss eine zusätzliche Hydroxygruppe am C₁-Atom des aromatischen Ringes eingeführt werden. Im Verlaufe der Ringspaltung wird die paraständige Hydroxygruppe abgespalten, sodass schliesslich pro Mol Gallussäure 1 Mol Kohlendioxid und 3 Mole Acetat gebildet werden.

Die fortgesetzte Kultivierung von *Pelobacter acidigallici* auf Gallussäure könnte der Grund sein, dass dieses Substrat schneller abgebaut wird als das postulierte Zwischenprodukt Phloroglucinol. Andererseits könnte die Decarboxylierung von Gallussäure zu Pyrogallol und die para-Transhydroxylierung zu Phloroglucinol nur eine Seitenreaktion darstellen, die nichts mit dem anaeroben Ringaufschluss zu tun hat. Auch könnte bei Anwesenheit von grösseren Mengen an Gallussäure ein Teil derselben zu Pyrogallol und weiter zu Phloroglucinol umgewandelt werden und nach Verschwinden der Gallussäure könnte eine Rückreaktion von Phloroglucinol via Pyrogallol wieder zu Gallussäure eintreten. Dies würde ebenfalls erklären, warum der Abbau von Pyrogallol und Phloroglucinol langsamer erfolgt als die Mineralisierung der Gallussäure.



Figur 11: Hypothetischer Abbauweg von Gallussäure nach dem von Evans (28) postulierten Ringspaltungsmechanismus.

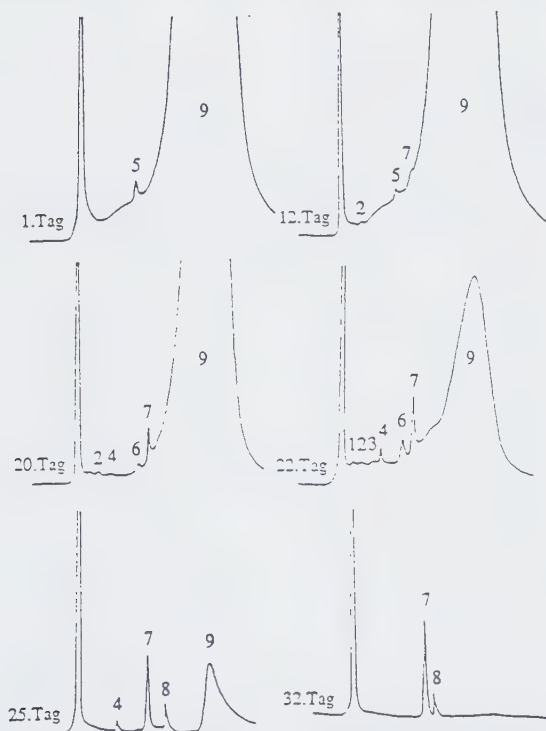
1 = Gallussäure, 2 = Pyrogallol, 3 = 2,5-Resorcinoloxid, 4 = Phloroglucinol, 5 = 1,3-Dihydroxy-5-oxocyclohex-1,3-dien, 6 = 3,5-Dihydroxy-2,4-dienhexancarbonsäure, 7 = 5-Hydroxy-3-oxo-4-enhexancarbonsäure, 8 = 3-Hydroxy-2-enbuttersäure, 9 = 3-Oxobuttersäure, 10 = Acetat



Figur 12: Hypothetischer Abbau von Gallussäure ohne Bildung von Phloroglucinol als Zwischenprodukt

1 = Gallussäure, 2 = Pyrogallol, 3 = 5,6-Dihydroxy-2,4-dienhexansäure, 4 = 3,5,6-Trihydroxy-4-enhexancarbonsäure, 5 = Acetat, 6 = 3,4-Dihydroxy-2-enbuttersäure, 7 = 2-Hydroxyacetat, 8 = 1,2-Dihydroxy-3-oxocyclohex-1,5-dien, 9 = 5,6-Dihydroxy-3,5-dienhexancarbonsäure, 10 = 6-Hydroxy-3,5-dienhexancarbonsäure, 11 = 4-Hydroxy-3-enbuttersäure

Die anaerobe aromatische Ringspaltung nach Figur 12 ist ebenso wahrscheinlich wie die Ringöffnung nach Samain et al. (Figur 11). In meinen Experimenten konnte jedoch nur wenig Pyrogallol und Phloroglucinol beim Abbau von Gallussäure nachgewiesen werden. Dies deutet eher auf eine Seitenreaktion hin. Die andere Hypothese, die die geringen Konzentrationen an Phloroglucinol erklären könnte, wäre die unverzügliche Metabolisierung dieses Zwischenproduktes nach dessen Bildung aus Pyrogallol.

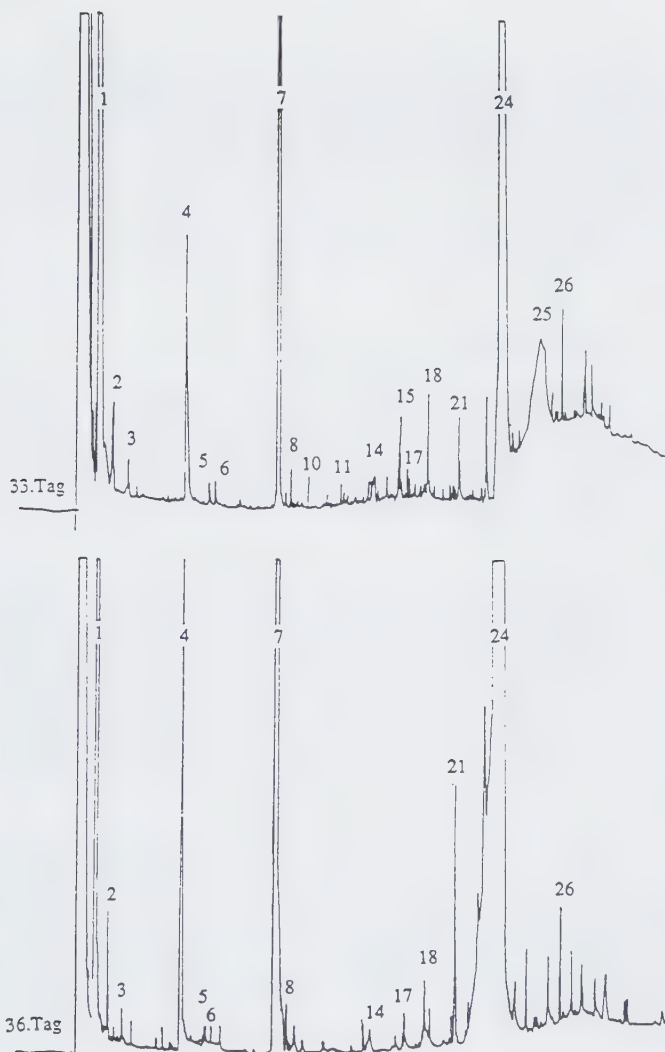


Figur 13: Analyse der Zwischenprodukte beim Abbau von Gallussäure durch *Pelobacter acidigallici* mittels Hochdruckflüssigchromatographie (Säule: HPX-87H, Messwellenlänge 210 nm).

Signal Nr. 9 = Gallussäure, Signal Nr. 7 = Acetat, die übrigen Substanzen sind unbekannte Zwischenprodukte.



Figur 14:



Figur 14: Analyse der Zwischenprodukte beim Abbau von Gallussäure durch *Pelobacter acidigallici* mittels Kapillargaschromatographie (Säule: 4 % PS-255). Signal Nr. 25 = Gallussäure, Signal Nr. 1 = Acetat, die restlichen Substanzen sind unbekannte Komponenten und Zwischenprodukte.

Durch Identifizierung von Zwischenprodukten des anaeroben Abbaus von Gallussäure wurde versucht, den Verlauf des Gallussäureabbaus zu charakterisieren. Mittles Hochdruckflüssigchromatographie (Figur 13) und Kapillargaschromatographie (Figur 14) konnte gezeigt werden, dass es Substanzen gibt, die während des Abbaus vorübergehend auftreten und wieder verschwinden.

Die erhaltenen Massenspektren von möglichen Zwischenprodukten haben nicht zur weiteren Aufklärung des Abbauweges geführt.

6. Mineralisierung von Acetat durch *Methanococcus mazei*

Der dritte Organismus, der aus der Mischkultur isoliert wurde, ist ein Methanbakterium. Dieses Bakterium übernimmt die Metabolisierung des anfallenden Acetats aus der Demethylierung der Syringasäure durch *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich, wie auch aus der Ringspaltung von Gallussäure durch *Pelobacter acidigallici*. Als Endprodukte entstehen Methan und Kohlendioxid.

Die Morphologie dieses Bakteriums zeigt grosse Ähnlichkeit mit dem von Mah (64) und Zhilina (118) beschriebenen *Methanococcus mazei*. So findet man in exponentiell wachsenden Kulturen methanosarcinaartige Formen, während ältere Kulturen irreguläre Pakete von Kokken zeigen. Auch das Substratspektrum stimmt mit *Methanococcus mazei* überein. Neben Acetat wächst das Bakterium auch auf Methanol, Methylamin und Trimethylamin. Wasserstoff/Kohlendioxid werden, im Gegensatz zu anderen Substraten, nur sehr langsam verwertet.

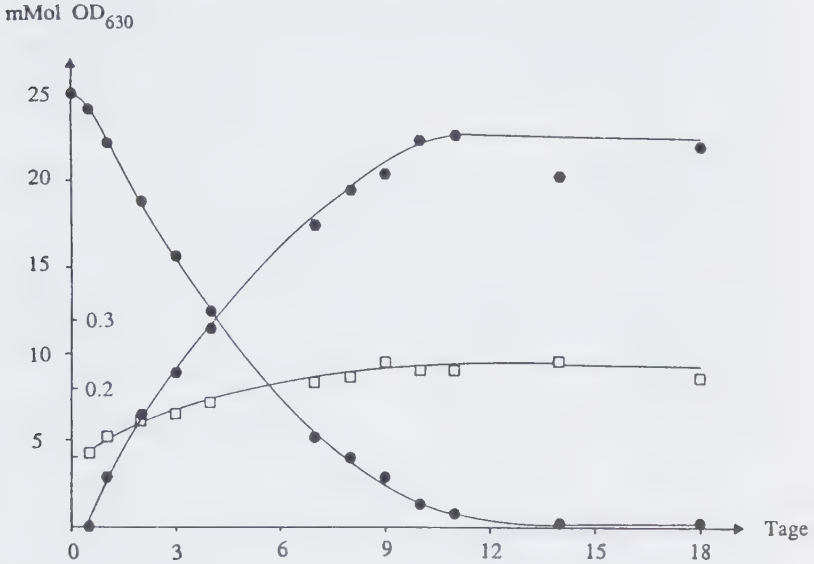
Die Versuche zum Acetatabbau wurden mit relativ dicht gewachsenen Kulturen durchgeführt, da dünn angeimpfte Kulturen ein schlechtes Wachstum auf Acetat zeigten (Figur 15). Da das System mit Bicarbonat gepuffert war, konnte als Endprodukt nur Methan bestimmt werden.

Anhand der Kohlenstoffbilanz ergibt sich, unter der Annahme, dass gleiche Mengen Kohlendioxid und Methan entstehen, die folgende Gleichung für den Abbau von Acetat.



Von 25.0 mMol Acetat wurden 22.1 mMol Methan respektive 22.1 mMol Kohlendioxid produziert. Die Zunahme der optischen Dichte (OD₆₃₀)

betrug 0.107, was einer Biomasseproduktion von 1.02 mMol entspricht. Für die Synthese dieser Biomasse waren 2.15 mMol Acetat notwendig (siehe Seite 69). 1.3 mMol Acetat wurden durch die jeweiligen Probenentnahmen aus dem System entfernt. Damit werden 103 % des eingesetzten Kohlenstoffs in den Produkten Methan, Kohlendioxid und Biomasse wiedergefunden.



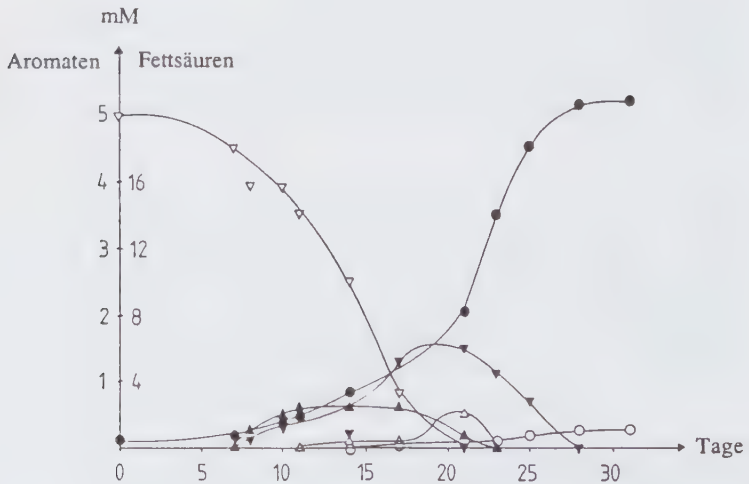
Figur 15: Mineralisierung von Acetat durch *Methanococcus mazei*

- = Acetat
- = Methan, beziehungsweise Kohlendioxid (berechnet)
- = OD₆₃₀

7. Abbau von 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure durch die Bakteriengemeinschaft *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich und *Pelobacter acidigallici*

Die Zweiergemeinschaft, bestehend aus *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich und *Pelobacter acidigallici*, vermag bestimmte trimethoxylierte aromatische Substanzen abzubauen. Unter fermentierenden Bedingungen entstehen dabei Acetat und Butyrat, unter sulfatreduzierenden Bedingungen werden Acetat und Sulfid produziert.

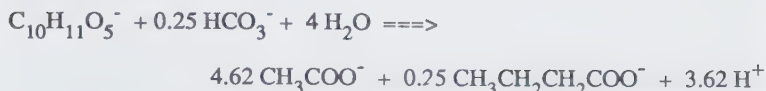
Beim Abbau von 5.0 mMol Trimethoxybenzoesäure (Figur 16) durch die Zweiergemeinschaft wurden 20.1 mMol Acetat und 1.1 mMol Butyrat produziert.



Figur 16: Fermentierender Abbau von 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure durch die Zweiergemeinschaft *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich und *Pelobacter acidigallici*

- ▽ = 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure
- ▲ = Dimethoxymonohydroxybenzoesäure
- ▼ = Dihydroxymonomethoxybenzoesäure
- △ = Gallussäure
- = Butyrat
- = Acetat

Es gilt folgende Stöchiometrie:

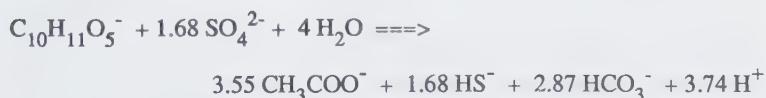


Die Zunahme der optischen Dichte (OD_{630}) beträgt 0.108, was einer Biomasseproduktion von 0.85 mMol entspricht. Für die Produktion von 20.1 mMol Acetat und 1.1 mMol Butyrat werden 4.4 mMol 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure benötigt, für die Synthese von 0.85 mMol Biomasse sind 0.33 mMol 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure notwendig (siehe Seite 69). Somit werden 95 % der eingesetzten 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure in den Produkten wiedergefunden.

Ist Sulfat vorhanden, so wird weniger Acetat gebildet. Die Methoxygruppen des Aromaten werden von *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich nicht mehr zu Acetat fermentiert, sondern die freiwerdenden Reduktionsäquivalente werden auf den Sulfatschwefel übertragen.

Aus 5.3 mMol Trimethoxybenzoesäure (Figur 17) werden nach 58 Tagen durch die Zweiergemeinschaft unter sulfatreduzierenden Bedingungen 16.7 mMol Acetat und 7.88 mMol Sulfid produziert. Butyratbildung konnte nicht festgestellt werden.

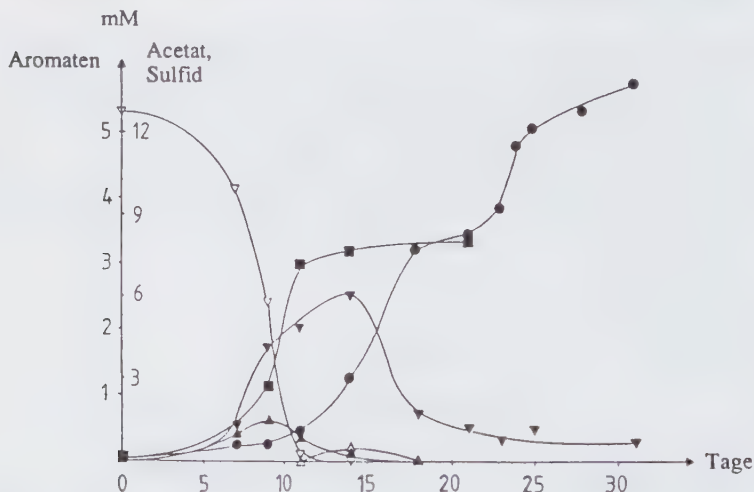
Es gilt folgende Stöchiometrie:



Die Zunahme der optischen Dichte (OD_{630}) beträgt 0.134, was einer Biomasseproduktion von 1.06 mMol entspricht. Für die Produktion von 16.7 mMol Acetat und 7.88 mMol Sulfid werden 4.7 mMol 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure benötigt, für die Synthese von 1.06 mMol Biomasse sind 0.42 mMol 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure notwendig (siehe Seite 69). Somit werden 97 % des eingesetzten Substrates in den Produkten wieder gefunden.

Bei der Annahme, die Biomasse von *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich nehme pro mMol fermentierte Methoxygruppe um 0.04 mMol zu, würden beim Abbau von 15.9 mMol Methoxygruppen 0.64 mMol Biomasse durch *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich produziert. Dafür wären 1.77 mMol Methoxygruppen notwendig. Die verbleibenden 14.13 mMol

Methoxygruppen werden zu Kohlendioxid oxidiert, wobei 10.6 mMol Sulfat zu Sulfid reduziert werden können. Total wurden aber nur 7.88 mMol Sulfid gemessen. Das würde 74 % der erwarteten Menge entsprechen. Die grosse Diskrepanz zwischen der erwarteten Sulfidmenge und der effektiv produzierten lässt sich dadurch erklären, dass die verwendete Kultur von *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich fermentativ vorkultiviert wurde, sodass vor allem zu Beginn des Aromatenabbaus nicht nur eine Sulfatreduktion stattfand, sondern dass ein Teil der Methoxygruppen auch fermentativ abgebaut wurden. Neben Sulfatreduktion fand auch eine Acetatproduktion durch *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich statt. Dies lässt sich anhand der ermittelten Gleichung belegen, konnten doch 97 % des Substrates in den Produkten Acetat, Sulfid und Biomasse wieder gefunden werden.



Figur 17: Sulfatreduzierender Abbau von 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure durch die Zweiergemeinschaft *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich und *Pelobacter acidigallici*

- ▽ = 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure
- ▲ = Dimethoxymonohydroxybenzoesäure
- ▼ = Dihydroxymonomethoxybenzoesäure
- △ = Gallussäure
- = Acetat
- = Sulfid

Diskussion

Aus Seesediment des Zürichsees wurde eine aromatenabbauende Mischkultur angereichert, die die Fähigkeit besass, Syringasäure vollkommen zu Methan und Kohlendioxid zu metabolisieren (50). Die einzelnen Organismen dieser Bakteriengemeinschaft wurden isoliert und charakterisiert. Der Organismus, der in der Mischkultur als erstes die substituierten Aromaten demethyliert, kann in Reinkultur auch auf Methanol wachsen. Er konnte als *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich identifiziert werden. Bisher sind neben *Acetobacterium woodii* (120) erst wenige Organismen beschrieben worden, die methoxylierte Phenolester demethylieren (54). Unter fermentierenden Bedingungen entstehen Acetat und Butyrat als Endprodukte (Figur 5). Methoxygruppen von Aromaten werden auch unter sulfatreduzierenden Bedingungen abgespalten. Dabei entstehen das Hydroxyderivat des Aromaten, Kohlendioxid und Sulfid (Figur 7). Steht der Kultur genügend Sulfat zur Verfügung, wird kein Acetat gebildet. Die freiwerdenden Reduktionsäquivalente werden vollständig auf den Sulfatschwefel übertragen. Methanolverwertende Sulfatreduzenten sind erst seit kurzem bekannt. *Desulfotomaculum orientis* (54) wächst ebenfalls fermentativ ohne Sulfat auf Formiat, Methanol, Äthanol, Laktat, Pyruvat und Trimethoxybenzoesäure. Dabei wird wie bei dem von uns isolierten *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich Acetat gebildet, wobei bei der Homoacetatgärung Kohlendioxid als Elektronenakzeptor dient. Im Unterschied zu *Desulfotomaculum orientis* ist der von uns isolierte Organismus auch fähig, auf n-Propanol, n-Butanol und Butyrat zu wachsen.

Die von Braun und Stolp (13) beschriebene Art von *Desulfovibrio* baut Methanol nur ab, wenn die Zellen zuvor auf Pyruvat, Malat oder Fumarat angezogen wurden. Dabei entsteht ausschliesslich Kohlendioxid als Endprodukt und ein Einbau von radioaktiv markiertem Methanol in die Zellen kann nicht festgestellt werden.

Ein weiteres sulfatreduzierendes Bakterium (67) kann neben Methanol auch Wasserstoff, Formiat, Äthanol, n-Propanol, n-Butanol, Glycerin, Succinat, Fumarat, Malat, Oxalacetat, Pyruvat und Laktat verwerten. Bei Wachstum auf Wasserstoff, Formiat oder Methanol ist Acetat als zusätzliche Kohlenstoffquelle notwendig. Es wurde als gekrümmtes, stäbchenförmiges, nicht sporenbildendes und nicht bewegliches Bakterium beschrieben.

Über den C_1 -Stoffwechsel bei Sulfatreduzenten ist bis heute wenig bekannt. *Desulfovibrio baarsii* (47) synthetisiert Acetyl-CoA aus den zwei C_1 -Komponenten Formiat und Kohlendioxid. Durchlässig gemachte Zellen von *Desulfovibrio baarsii* katalysieren den Austausch von markiertem Kohlendioxid mit der Carboxylgruppe von Acetyl-CoA, was typisch für den Acetyl-CoA-Weg ist.

Der Acetyl-CoA-Weg wird in sehr verschiedenen Bakteriengruppen (Acetogene (62), Sulfidogene (47) und Methanogene (115)) gefunden. Dieser Weg der Kohlendioxid-Fixierung und der Acetatsynthese scheint daher ursprünglich. Auch der hier isolierte *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich baut vermutlich Kohlendioxid über diesen Syntheseweg ein. Für den verwandten *Desulfotomaculum orientis* wird ein dem Acetyl-CoA-Weg sehr ähnlicher Stoffwechselweg vorgeschlagen. Physiologisch sind diese beiden Sulfatreduzenten in die Verwandtschaft der acetogenen *Clostridien* und von *Acetobacterium woodii* zu zählen.

Die bei der Oxidation von Methanol zu Kohlendioxid entstehenden Elektronen werden nicht als Wasserstoff freigesetzt, sondern dienen der Reduktion von Kohlenstoff oder Sulfat. Heijthuijsen und Hansen (42) postulieren, dass ein Teil des Methanols zu Kohlendioxid oxidiert wird. Die dabei freiwerdenden Reduktionsäquivalente reduzieren Kohlendioxid zur Carboxylgruppe von Acetat. In Gegenwart von Sulfat werden die Elektronen von diesem abgefangen und es entsteht Sulfid. Wasserstoff wird nie freigesetzt, da Hydrogenase fehlt.

Bei Acetatkonzentrationen oberhalb 5 mMol/l wird neben Acetat auch Butyrat gebildet. Dies wurde auch bei *Desulfotomaculum orientis* beobachtet. Wird Butyrat gebildet, können zusätzliche Reduktionsäquivalente auf das Fermentationsprodukt übertragen werden, da die durchschnittliche Oxidationszahl des Kohlenstoffs im Butyrat tiefer ist als im Acetat (Figur 6).

Der fermentierende Abbau von Laktat und Pyruvat führt zu Acetat, Butyrat und Kohlendioxid. Laktat wird vermutlich via Pyruvat oxidiert. Durch Abspaltung der Carboxylgruppe entstehen Acetat und Kohlendioxid. Die dabei freigesetzten Elektronen werden auf Kohlendioxid übertragen und es entsteht zusätzlich Acetat. Aus Laktat wird entsprechend mehr Acetat produziert. Ist Sulfat vorhanden, wird Sulfid produziert. Unter sulfatreduzierenden Bedingungen wird daher weniger Acetat gebildet als in Abwesenheit von Sulfat.

Bei grösseren Konzentrationen an Methanol (> 30 mM) wird das Substrat nicht mehr vollständig abgebaut. Unter fermentierenden Bedingungen führt die grosse Acetatproduktion in Batchkulturen zu einer pH-Senkung. Bei einem pH-Wert unterhalb 5.4 ist keine weitere Methanolvergärung mehr feststellbar (Figur 8).

Unter sulfatreduzierenden Bedingungen führt die starke Sulfidbildung ebenfalls zu einem Wachstumsstillstand der Kulturen. Durch die hohe Sulfidkonzentration kann das Löslichkeitsprodukt der Spurenelemente überschritten werden, sodass diese ausfallen und somit den Organismen nicht mehr zur Verfügung stehen. Andererseits könnte die hohe Sulfidkonzentration auf die Bakterien direkt toxisch wirken.

Desulfotomaculum orientis Stamm Zürich hat, wie andere Desulfurikanten, die Fähigkeit, sich an wechselnde Oxidationsmittel anzupassen. Bei der Umstellung vom sulfatreduzierenden auf den fermentierenden Stoffwechsel zeigt sich eine Lagphase von zehn Tagen; erst dann hat sich der Organismus den neuen Bedingungen angepasst und eine Acetatproduktion ist feststellbar (Figur 9). Im Gegensatz dazu setzt die Umstellung von Fermentation auf Sulfatreduktion unmittelbar nach Sulfatzugabe ein, ohne dass dabei die Acetatproduktion augenblicklich zum Erliegen kommt. Dies wird auch beobachtet, wenn fermentativ gewachsene Zellen in ein sulfathaltiges Medium überimpft werden; neben Sulfid wird von Anfang an auch Acetat gebildet (Figur 17).

Die Enzyme für den dissimilativen Methanolabbau unter sulfatreduzierenden Bedingungen scheinen daher konstitutiv zu sein, da Sulfat sofort als Elektronenakzeptor verwendet werden kann. Beim fermentierenden Methanolabbau muss immer eine Umstellung erfolgen, wobei das induzierbare Enzym an der Reduktion von Kohlendioxid zur Carboxylgruppe von Acetat oder an der Übertragung des Kohlendioxids auf die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase beteiligt sein muss. Ob die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase beim untersuchten *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich immer vorhanden ist oder erst induziert werden muss, ist unbekannt. Die Assimilation von Kohlenmonoxid ist bis heute nicht geklärt, da das Gas auf die Organismen hemmend wirkt.

Der zweite Organismus, der aus der angereicherten Mischkultur isoliert wurde, spaltet den Aromaten und ist fähig, aromatische Monomere, die drei Hydroxygruppen in bestimmter Position aufweisen, in einer Homoacetatfermentation abzubauen. Diese Reaktionen konnten bis heute erst bei wenigen Organismen beobachtet werden (*Pelobacter acidigallici* (78), *Streptococcus bovis* (93), *Coprococcus* sp. (94) und *Eubacterium oxidoreducens* (58)). Da bei dieser Fermentation keine überschüssigen Reduktionsäquivalente als Wasserstoff freigesetzt werden, ist eine Cokultur mit einem wasserstoffverwertenden Bakterium nicht notwendig.

Die genannten Organismen wachsen daher nur auf stark oxidierten Aromaten (Gallussäure, 2,3,4-Trihydroxybenzoesäure, 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure, Pyrogallol und Phloroglucinol (Figur 10)). Diese besitzen alle je drei Hydroxygruppen und werden in der Regel in einer Homoacetatfermentation in drei Mole Acetat gespalten. Bei den hydroxylierten Benzoesäuren wird bei der Abspaltung der Carboxygruppe auch Kohlendioxid freigesetzt. Dihydroxylierte aromatische Substanzen, wie beispielsweise Protocatechusäure oder Catechol werden von *Pelobacter acidigallici* nicht abgebaut (51).

Eubacterium oxidoreducens fermentiert Gallussäure, Pyrogallol, Phloroglucinol und Quercetin. Der aromatische Ring wird aber nicht wie bei den

andern Organismen zu Acetat fermentiert, sondern es entsteht auch das reduzierte Butyrat als Endprodukt. *Eubacterium oxidoreducens* benötigt daher Wasserstoff als Cosubstrat für die anaerobe Ringspaltung.

Der Abbauweg der Gallussäure ist nach wie vor offen. Massenspektren von möglichen Zwischenprodukten brachten keine weitere Klärung des Abbauweges. Als erster Schritt im Gallussäureabbau darf die Decarboxylierung des aromatischen Ringes zu Pyrogallol angenommen werden. Als folgenden Abbauschritt wird die Transhydroxylierung zu Phloroglucinol postuliert. Die geringen Mengen an Phloroglucinol, die in der Kulturflüssigkeit nachzuweisen waren, können einen weiteren Schritt im Gallussäureabbau darstellen. Es wäre aber auch möglich, dass Phloroglucinol bei Anwesenheit von grösseren Mengen Pyrogallol in einer Seitenreaktion entsteht. Andererseits konnte in den Massenspektren 1,3-Dihydroxy-5-oxocyclohex-1-en vermutet werden. Das deutet an, dass der Abbau der Gallussäure tatsächlich über Pyrogallol und Phloroglucinol verlaufen könnte. Phloroglucinol würde dann zu 1,3-Dihydroxy-5-oxocyclohex-1-en reduziert und zu 3,5-Dihydroxyhex-2-encarbonsäure gespalten. Diese hydroxylierte Hexensäure kann dann nach dem Schema der β -Oxidation über 5-Hydroxy-3-oxohexancarbonsäure zu Acetat und 3-Hydroxybuttersäure abgebaut und letztere über 3-Oxobuttersäure weiter zu Acetat gespalten werden.

Die Frage, welche C-Quelle Aromatenspalter in ihrem natürlichen Standort, in den Seesedimenten nutzen, ist ungeklärt. Es ist unwahrscheinlich, dass das anaerobe Seesediment genügend trihydroxylierte Aromaten enthält. Die Aromaten dürfen in der oxidierten Zone des Sedimentes nicht hydroxyliert vorliegen, da Oxidationen zur Radikalbildung führen und die einzelnen Monomere polymerisieren würden. Die Methoxygruppen schützen die Monomere in aeroben Zonen vor Oxidationen.

Der dritte Organismus, der aus der Mischkultur isoliert wurde, ist ein Methanbakterium, *Methanococcus mazei*. Acetat aus der Abspaltung der Methylgruppen durch *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich und aus der Ringspaltung durch *Pelobacter acidigallici* wird zu Methan und Kohlendioxid disproportioniert (Figur 15). Da *Methanococcus* ein für Methanbakterien relativ grosses Substratspektrum aufweist, - neben Acetat können auch Methanol, Methylamin und Wasserstoff/Kohlendioxid verwertet werden, - dürfte es in verschiedenen Mischkulturen als Begleitorganismus wirken. In anaeroben Seesedimenten bringt die Fähigkeit der Verwertung von verschiedenen Substraten Vorteile.

Methanococcus mazei wird von Mah (64) als sehr aktiver Methanproduzent mit kurzen Generationszeiten beschrieben. Daher kann sich dieser Organismus in der angereicherten Mischkultur gegenüber anderen Methanogenen durchsetzen. In der Natur selbst konnte *Methanococcus mazei* bisher in verschiedenen Habitaten nachgewiesen werden (64).

Die aus der angereicherten syringasäureabbauenden Mischkultur isolierten Bakterienpopulationen, *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich und *Pelobacter acidigallici*, wurden in definierter Mischkultur gezogen. Dabei zeigte sich, dass 3,4,5,-Trimethoxybenzoesäure unter fermentierenden Bedingungen zu Acetat und Butyrat abgebaut wird (Figur 16). Unter sulfatreduzierenden Bedingungen wurde weniger Acetat produziert (Figur 17). Ein grosser Teil der Methoxygruppen von 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure wurde nicht zu Acetat fermentiert, sondern zu Kohlendioxid oxidiert. Daher war die gebildete Menge an Acetat pro mMol abgebaute 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure geringer als unter fermentierenden Bedingungen. Da die verwendete Kultur von *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich fermentativ vorkultiviert wurde, fand nicht nur eine Sulfatreduktion statt, sondern ein Teil der Methoxygruppen wurde auch fermentativ abgebaut. Neben der Sulfatreduktion fand somit auch eine Acetatproduktion durch *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich statt. Anhand der Kenntnisse aus den Reinkulturen stimmen diese Feststellungen mit den Erwartungen überein.

Eine fermentierende Ringspaltung durch eine Mischkultur ist ökologisch von grosser Bedeutung. Viele Substanzen mit aromatischen Ringen im Molekül sind Problemchemikalien, wenn sie in anaerobe Ökosysteme gelangen. Aromatenabbauende Organismen, wie die hier beschriebenen, übernehmen eine Entgiftung von anaeroben Sedimenten und Böden z.B. von Bioziden mit aromatischen Strukturen.

Die Fähigkeit des demethylierenden Sulfatreduzenten, auch fermentativ zu wachsen, ist physiologisch und ökologisch eine interessante Adaptationsfähigkeit. Besonders in Süsswassersedimenten mit wenig Sulfat dürfte diese Fähigkeit für den Organismus grosse Vorteile bieten.

Literaturverzeichnis

- 1 Bache R. and Pfennig N., 1981. Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. Archives of Microbiology 125, 255 - 261.
- 2 Badziong W., Thauer R.K. and Zeikus J.G., 1978. Isolation and characterization of *Desulfovibrio* growing on hydrogen plus sulfate as the sole energy source. Archives of Microbiology 116, 41 - 49.
- 3 Balba M.T. and Evans W.C., 1980. The anaerobic dissimilation of benzoate by *Pseudomonas aeruginosa* coupled with *Desulfovibrio vulgaris*, with sulfate as terminal electron acceptor. Biochemical Society Transactions 8, 624 - 625.
- 4 Balch W.E., Schoberth S., Tanner R.S. and Wolfe R.S., 1977. *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology 27, 355 - 361.
- 5 Barker H.A., 1956. Biological formation of methane. Industrial and Engineering Chemistry 48, 1438 - 1442.
- 6 Barker H.A., 1956. Bacterial fermentations. Wiley-Interscience, New York.
- 7 Bligh E.G. and Dyer W.J., 1959. A rapid method of lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 37, 911 - 917.
- 8 Bobbie R.J. and White D.C., 1980. Characterisation of benthic microbial community structure by high resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. Applied and Environmental Microbiology 39, 1212 - 1222.
- 9 Body S.A., Shelton D.R., Berry D. and Tiedje J.M., 1983. Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digest sludge. Applied and Environmental Microbiology 46, 50 - 54.
- 10 Boyd S.A. and Shelton D.R., 1984. Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. Applied and Environmental Microbiology 47, 272 - 277.
- 11 Brandis A. and Thauer R.K., 1981. Growth of *Desulfovibrio* species on hydrogen and sulphate as sole energy source. Journal of General Microbiology 126, 249 - 252.
- 12 Brandl H., 1987. Mikrobielle Prozesse unter oxidationsmittel-limitierten Bedingungen an der Sediment-Wasser-Übergangszone in Seen. Dissertation Universität Zürich.

- 13 Braun M. and Stolp H., 1985. Degradation of methanol by a sulfate reducing bacterium. Archives of Microbiology 142, 77 - 80.
- 14 Butler J.H.A. and Buckerfield J., 1979. Digestion of lignin by termites. Soil Biology Biochemistry 11, 507 - 513.
- 15 Campbell L.L. and Postgate J.R., 1965. Classification of the sporeforming sulfate-reducing bacteria. Bacteriological Reviews 29, 359 - 363.
- 16 Caseley J.C., 1968. The loss of three chloronitrobenzene fungicides from soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 3, 180 - 193.
- 17 Chapman P.J., 1976. Microbial degradation of halogenated compounds. Biochemical Society Transactions 4, 463 - 466.
- 18 Colberg P.J. and Young L.Y., 1982. Biodegradation of lignin-derived molecules under anaerobic conditions. Canadian Journal Microbiology 28, 886 - 889.
- 19 Colberg P.J. and Young L.Y., 1985. Aromatic and volatile acid intermediates observed during anaerobic metabolism of lignin derived oligomers. Applied and Environmental Microbiology 49, 350 - 358.
- 20 Dagley S., 1960. New pathways in the oxidative metabolism of aromatic compounds by micro-organisms. Nature 188, 560 - 566.
- 21 Diekert C.B. and Thauer R.K., 1978. Carbon monoxide oxidation by *Clostridium thermoaceticum* and *Clostridium formicoaceticum*. Journal of Bacteriology 136, 597 - 606.
- 22 Doddema H.J., Hutten T.J., Van der Drift C. and Vogels G.D., 1978. ATP hydrolysis and synthesis by the membrane-bound ATP synthetase complex of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Journal of Bacteriology 136, 19 - 23.
- 23 Dubach A.C. and Bachofen R., 1985. Methanogens. A short taxonomic overview. Experientia 41, 441 - 446.
- 24 Dutton P.L. and Evans W.C., 1978. Metabolism of aromatic compounds by *Rhodospirillaceae*. In: Clayton R.C. and Sistron W.R., eds., The photosynthetic bacteria, Plenum Press, New York, 719 - 726.

- 25 Eikmanns B. and Thauer R.K., 1985. Evidence for the involvement and role of a corrinoid enzyme in methane formation from acetate in *Methanosarcina barkeri*. Archives of Microbiology 142, 175 - 179.
- 26 Engel R.R., Madsen F.M., Chapmann S.S. and Schwartz S., 1972. Carbon monoxide production from heme compounds by bacteria. Journal of Bacteriology 112, 1310 - 1315.
- 27 Escalante-Semerena J.C. and Wolfe R.S., 1985. Tetrahydromethanopterin-dependent methanogenesis from non-physiological C₁-donors in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Journal of Bacteriology 161, 696 - 701.
- 28 Evans W.C., 1977. Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. Nature 270, 17 - 22.
- 29 Fabig W., Otton J.C.G. and Müller F., 1980. Failure of denitrifying to utilize benzoic acid under anaerobic conditions with nitrate as the only terminal electron acceptor. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 9, 133 - 135.
- 30 Focht D.D. and Alexander M., 1971. Aerobic cometabolism of DDT analogues by *Hydrogenomonas* sp.. Journal of Agricultural Food Chemistry 19, 20 - 22.
- 31 Fox G.E., Magrum L.J., Balch W.E., Wolfe R.S. and Woese C.R., 1977. Classification of methanogenic bacteria by 16 S ribosomal RNA characterization. Proceedings of National Science USA 74, 4537 - 4541.
- 32 Fox G.E., Stackebrandt E., Hespell R.B., Gibson J., Maniloff J., Dyer T.A., Wolfe R.S., Balch W.E., Tanner R.S., Magrum L.J., Zablen L.B., Blakemore R., Gupta R., Bonen L., Lewis B.J., Stahl D.A., Luehrs K.R., Chen K.N. and Woese C.R., 1980. The phylogeny of prokaryotes. Science 209, 457 - 463.
- 33 Fuchs C., 1984. Wechselwirkungen zwischen *Streptococcus faecium* 68 und *Escherichia coli* in einem simplen Chemostaten. Diplomarbeit Universität Zürich.
- 34 Fuchs G. and Stupperich E., 1984. CO₂ reduction to cell carbon in methanogens. In: Crawford R.L. and Hanson R.S., eds., Microbial growth on C₁-compounds, American Society for Microbiology, Washington, 199 - 202.
- 35 Giger W., 1984. Das Verhalten organischer Waschmittelchemikalien in Abwasserreinigung und in den Gewässern. Mitteilungen der Eawag 18, 1 - 7.

- 36 Gilboa-Garber N., 1971. Direct spectrophotometric determination of inorganic sulfide in biological materials and in other complex mixtures. *Analytical Biochemistry* 43, 129 - 133.
- 37 Grbić-Galić D., 1986. Anaerobic production and transformation of aromatic hydrocarbons and substituted phenols by ferulic acid-degrading BESA-inhibited methanogenic consortia. *FEMS Microbiology Ecology* 38, 161 - 169.
- 38 Gregersen T., 1978. Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 5, 123 - 127.
- 39 Gunsalus R.P. and Wolfe R.S., 1978. Chromophoric factors F_{342} and F_{430} of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *FEMS Letters* 3, 191 - 193.
- 40 Hatchikian E.C., Chaigneau M. and Le Gall J., 1976. Analysis of gas production by growing cultures of three species of sulfate-reducing bacteria. In: Schlegel H.G., Gottschalk G. and Pfennig N., eds., *Microbial Production and Utilisation of Gases*, Goltze, Göttingen, 109 - 118.
- 41 Healy J.B., 1979. Biodegradation of simple aromatic compounds under methanogenic conditions. Dissertation Stanford University.
- 42 Heijthuijsen J.H.F.G. and Hansen T.A., 1986. Interspecies hydrogen transfer in co-cultures of methanol-utilizing acidogens and sulfate-reducing or methanogenic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 38, 57 - 64.
- 43 Hippe H., Caspari D., Fiebig K. and Gottschalk G., 1979. Utilisation of trimethylamine and other N-methyl compounds for growth and methane formation by *Methanosarcina barkeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 76, 494 - 498.
- 44 Holder U., Schmidt D.E., Stupperich E. and Fuchs G., 1985. Autotrophic synthesis of activated acetic acid from two CO_2 in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. III. Evidence for common one-carbon precursor pool and the role of corrinoid. *Archives of Microbiology* 141, 229 - 238.
- 45 Horowitz A., Shelton D.R., Cornell C.P. and Tiedje J.M., 1982. Anaerobic degradation of aromatic compounds and digest sludge. *Developments Industrial Microbiology* 23, 435 - 444.

- 46 Hungate R.E., 1969. A Roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris J.R. and Ribbons D.W., Methods in Microbiology, Academic Press, New York, Vol. 3B, 117 - 133.
- 47 Jansen K., Thauer R.K., Widdel F. and Fuchs G., 1984. Carbon assimilation pathways in sulfate reducing bacteria. Formate, carbon dioxide, carbon monoxide, and acetate assimilation by *Desulfovibrio baarsii*. Archives of Microbiology 138, 257 - 262.
- 48 Jones J.B. and Stadtman T.C., 1976. *Methanococcus vannielii*: Growth and metabolism of formate. In: Schlegel H.G., Gottschalk G. and Pfennig N., eds., Microbial Production and Utilization of Gases, 199 - 205.
- 49 Jungermann K. and Schön G., 1974. Pyruvate, formate lyase in *Rhodospirillum rubrum* Ha adapted to anaerobic dark conditions. Archives of Microbiology 99, 109 - 116.
- 50 Kaiser J.-P. and Hanselmann K.W., 1982. Fermentative metabolism of substituted monoaromatic compounds by a bacterial community from anaerobic sediments. Archives of Microbiology 133, 185 - 194.
- 51 Kaiser J.-P. and Hanselmann K.W., 1982. Aromatic chemicals through anaerobic microbial conversion of lignin monomers. Experientia 38, 167 - 176.
- 52 Kenealy W.R., Thompsen T.E., Schubert K.R. and Zeikus J.G., 1982. Ammonia assimilation and synthesis of alanine, aspartate and glutamate in *Methanosarcina barkeri* and *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Journal of Bacteriology 150, 1357 - 1365.
- 53 Kenealy W.R. and Zeikus J.G., 1982. One carbon metabolism in methanogens; evidence for synthesis of a two carbon intermediate and unification of catabolism and anabolism in *Methanosarcina barkeri*. Journal of Bacteriology 151, 932 - 941.
- 54 Klemps R., Cypionka H., Widdel F. and Pfennig N., 1985. Growth with hydrogen, and further physiological characteristics of *Desulfotomaculum* species. Archives of Microbiology 143, 203 - 208.
- 55 Kluver A.J. and Schnellen Ch.G.T.P., 1947. On the fermentation of carbon monoxide by pure cultures of methane bacteria. Archives of Biochemistry 14, 57 - 70.
- 56 Konings W.N. and Veldkamp H., 1980. Phenotypic responses to environmental change. In: Ellwood D.C., ed., Contemporary microbial ecology, Academic Press, London, 161 - 191.

- 57 König H., Kralik R. and Kandler O., 1982. Structure and modification of pseudomurein in Methanobacteriales. Zentralblatt für Bakteriologie Hygiene Abt. 1 Originale; Band C3.
- 58 Krumholz L.R. and Bryant M.P., 1986. *Eubacterium oxidoreducens* sp. nov. requiring H₂ or formate to degrade gallate, pyrogallol, phloroglucinol and quercetin. Archives of Microbiology 144, 8 - 14.
- 59 Kühn W., Fiebig K., Walther R. and Gottschalk G., 1979. Presence of a cytochrome b₅₅₉ in *Methanosarcina barkeri*. FEBS Letters 105, 271 - 274.
- 60 Lamparski L.L. and Nestruck T.J., 1978. Determination of trace phenols in water by gas chromatographic analysis of heptafluorobutyryl derivatives. Journal of Chromatography 156, 143 - 151.
- 61 Lindmark D.G., Paoletta P. and Wood N.P., 1969. The pyruvate formate-lyase system of *Streptococcus faecalis*. Journal of Biological Chemistry 244, 3605 - 3612.
- 62 Ljungdahl L.G. and Wood H.G., 1982. Acetate biosynthesis. In: Dolphin D., ed., B₁₂, 165 -202.
- 63 Lynd L.H., Kerby R. and Zeikus J.G., 1982. Carbon monoxide metabolism of the methylotrophic acidogen *Butyribacterium methylophilum*. Journal of Bacteriology 149, 255 - 263.
- 64 Mah R.A., 1980. Isolation and characterisation of *Methanococcus mazei*. Current Microbiology 3, 321 - 326.
- 65 Marmur J., 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. Journal of Molecular Biology 3, 208 - 218.
- 66 Mikesell M.D. and Boyd S.A., 1986. Complete reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol by anaerobic microorganisms. Applied and Environmental Microbiology 52, 861 -865.
- 67 Nanninga H.J. and Gottschal J.C., 1986. Isolation of a sulfate-reducing bacterium growing with methanol. FEMS Microbiology Ecology 38, 125 - 130.
- 68 Oshima T., 1965. On the anaerobic metabolism of aromatic compounds in the presence of nitrate by soil microorganisms. Applied and Environmental Microbiology 46, 661 - 665.

- 69 Panganiban A.T., Patt T.E., Hart W. and Hanson R.S., 1979. Oxidation of methane in the absence of oxygen in lake water samples. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 303 - 309.
- 70 Parker J.H., Smith G.A., Fredrickson H.L., Vestal J.R. and White D.C., 1982. A sensitive assay for gram negative bacteria in sediments based on hydroxy fatty acids from lipopolysaccharide lipid A. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 1170 - 1177.
- 71 Pezacka E. and Wood H.G., 1984. Role of carbon monoxide dehydrogenase in the autotrophic pathway used by acetogenic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81, 63 - 69.
- 72 Pfaltz A., Jaun B., Faessler A., Eschenmoser A., Jaenchen R., Gilles H.H., Dieckert G. und Thauer R.K., 1982. Zur Kenntnis des Faktors F_{430} aus methanogenen Bakterien: Struktur des porphinoïden Ligandensystems. *Helvetica Chimica Acta* 65, 828 - 865.
- 73 Postgate J.R., 1969. Methane as a minor product of pyruvate metabolism by sulphate-reducing and other bacteria. *Journal of General Microbiology* 57, 293 - 302.
- 74 Postgate J.R., 1984. *The sulfate-reducing bacteria*. Cambridge University Press, Cambridge.
- 75 Quayle J.R. and Pfennig N., 1975. Utilization of methanol by *Rhodospirillaceae*. *Archives of Microbiology* 102, 193 - 198.
- 76 Samain E., Albagnac G. and Dubourguier H.-C., 1986. Initial steps of catabolism of trihydroxybenzenes in *Pelobacter acidigallici*. *Archives of Microbiology* 144, 242 - 244.
- 77 Schink B. and Zeikus J.G., 1980. Microbial methanol formation: A major end product of pectin metabolism. *Current Microbiology* 4, 387 - 389.
- 78 Schink B. and Pfennig N., 1982. Fermentation of trihydroxybenzenes by *Pelobacter acidigallici* gen. nov. sp. nov., a new strictly anaerobic, non-sporeforming bacterium. *Archives of Microbiology* 133, 195 - 201.
- 79 Schink B., 1984. Fermentation of 2,3-butandiol by *Pelobacter carbinolicus* sp. nov. and *Pelobacter propionicus* sp. nov. and evidence for propionate formation from C_2 -compounds. *Archives of Microbiology* 137, 33 - 41.

- 80 Schulz J.E. and Breznak J.A., 1978. Heterotrophic bacteria present in hindguts of wood-eating termites (*Reticulitermes flavipes*). Applied and Environmental Microbiology 35, 930 - 936.
- 81 Segal W. and Starkey R., 1972. Microbial decomposition of methionine and identity of the resulting sulfur products. Journal of Bacteriology 98, 908 - 913.
- 82 Shelton E.R. and Tiedje J.M., 1984. Isolation and partial characterisation of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. Applied and Environmental Microbiology 48, 840 - 848.
- 83 Stanier R.Y. and Ornston L.N., 1973. The β -ketoadipate pathway. Advances in Microbial Physiology 9, 89 - 151.
- 84 Stupperich E. and Fuchs G., 1984. Autotrophic synthesis of activated acetic acid from two CO₂ in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. I. Properties of in vitro system. Archives of Microbiology 139, 8 -13.
- 85 Stupperich E. and Fuchs G., 1984. Autotrophic synthesis of activated acetic acid from two CO₂ in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. II. Evidence for different origins of acetate carbon atoms. Archives of Microbiology 139, 14 -20.
- 86 Sulflita J.M., Horowitz A., Shelton D.R. and Tiedje J.M., 1982. Dehalogenation: A novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds. Science 218, 1115 - 1117.
- 87 Sulflita J.M., Stout J. and Tiedje J.M., 1984. Dechlorination of (2,4,5-trichlorophenoxy) acetic acid by anaerobic microorganisms. Journal of Agricultural Food Chemistry 32, 218 - 221.
- 88 Taylor B.F., Campell W.L. and Chinoy I., 1970. Anaerobic degradation of the benzene nucleus by a facultatively anaerobic microorganism. Journal Bacteriology 102, 430 - 437.
- 89 Taylor J. and Parkes R.J., 1983. The cellular fatty acids of the sulfate-reducing bacteria, *Desulfobacter* sp., *Desulfobulbus* sp. and *Desulfovibrio desulfuricans*. Journal of General Microbiology 129, 3303 - 3309.
- 90 Thauer R.K., Kirchmayer F.H. and Jungermann K.A., 1972. Properties and function of the pyruvate-formate-lyase reaction in *clostridia*. European Journal of Biochemistry 27, 282 - 290.

- 91 Thauer R.K., Fuchs G. and Scherer P., 1976. The active species of "CO₂" utilized by enzymes involved in "CO₂" reduction to formate. In: Schlegel H.G., Gottschalk G. and Pfennig N., eds., Microbial Production and Utilization of Gases, Goltze, Göttingen, 157 - 162.
- 92 Toews M.L. and Adler J., 1979. Methanol formation in vivo from methylated chemotaxis proteins in *Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry 254, 1761 - 1764.
- 93 Tsai C.G. and Jones G.A., 1975. Isolation and identification of rumen bacteria capable of anaerobic phloroglucinol degradation. Canadian Journal Microbiology 21, 794 - 801.
- 94 Tsai C.G., Gates G.M., Ingledew W.M. and Jones G.A., 1976. Products of anaerobic phloroglucinol degradation by *Coprococcus* sp. Pe₁5. Canadian Journal Microbiology 22, 159 - 164.
- 95 Tschech A. and Pfennig N., 1984. Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. Archives of Microbiology 137, 163 - 167.
- 96 Tschech A. and Schink B., 1985. Fermentative degradation of resorcinol and resorcylic acids. Archives of Microbiology 143, 52 - 59.
- 97 Tschech A. and Schink B., 1986. Fermentative degradation of monohydroxybenzoates by defined syntrophic cocultures. Archives of Microbiology 145, 396 - 402.
- 98 Tsuchiya T. and Yamaha T., 1984. Reductive dechlorination of 1,2,4-trichlorobenzene by *Staphylococcus epidermidis*. Agricultural and Biological Chemistry 48, 1545 - 1550.
- 99 Uffen R.L., 1981. Metabolism of carbon monoxide. Enzyme and Microbial Technology 3, 197 - 206.
- 100 Ulitzur S., 1972. Rapid determination of DNA base composition by ultraviolet spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta 272, 1 - 11.
- 101 Van der Meijden P., Heythysen H.J., Pouwels A., Houwen F., Van der Drift C. and Vogels G.D., 1983. Methyltransferases involved in methanol conversion by *Methanosarcina barkeri*. Archives of Microbiology 134, 238 - 242.

- 102 Van der Meijden P., Heythysen H.J., Sliepenbeck H.T., Houwen F., Van der Drift C. and Vogels G.D., 1983. Activation and inactivation of methanol: 2-mercaptoethansulfonic acid methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. Journal of Bacteriology 135, 6 - 11.
- 103 Vogels G.D., Keltjens J.T., Hutten T.J. and Van der Drift C., 1982. Coenzymes of methanogenic bacteria. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene; Abteilung 1 - Originale; Band C3, 258 - 264.
- 104 Vogels G.D. and Visser C.M., 1983. Interconnection of methanogenic and acetogenic pathways. FEMS Letters 20, 291 - 297.
- 105 Walker J.R.L. and Taylor B.G., 1983. Metabolism of phloroglucinol by *Fusarium solani*. Archives of Microbiology 134, 123 - 126.
- 106 Wedemeyer G., 1967. Dechlorination of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl) ethane by *Aerobacter aerogenes*. I. Metabolic products. Applied Microbiology 15, 569 - 574.
- 107 Wedemeyer G., 1967. Biodegradation of dichlorodiphenyltrichloroethane: intermediates in dichlorodiphenylacetic acid metabolism in *Aerobacter aerogenes*. Applied Microbiology 15, 1494 - 1495.
- 108 Weimer P.J. and Zeikus J.G., 1978. One carbon metabolism in methanogenic bacteria. Archives of Microbiology 119, 49 - 57.
- 109 White D.C., Davis W.M., Nickels J.S., King J.D. and Bobbie R.J., 1979. Lipid analysis of sediments for microbial biomass and structure. In: Litchfield C.D. and Seyfried P.L. eds., Methodology for biomass determinations and microbial activities in sediments, ASTM, Philadelphia, 87 - 103.
- 110 White D.C., Smith G.A., Gehorn M.J., Parker J.H., Findlay R.H., Martz R.F. and Fredrickson H.L., 1983. The groundwater aquifer microbiota: Biomass, community structure and nutritional status. Developments in Industrial Microbiology 24, 201 - 211.
- 111 Widdel F., 1980. Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten sulfatreduzierender Bakterien. Dissertation Universität Göttingen.
- 112 Wiegel J., Braun M. and Gottschalk G., 1981. *Clostridium thermoautotrophicum* species novum, a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbon dioxide. Current Microbiology 5, 255 - 260.

- 113 Wolfe R.S. and Higgins I.J., 1979. Microbial biochemistry of methane - A study in contrasts. In: Quayle J.R., ed., International Review of Biochemistry, Microbial Biochemistry, 267 - 353.
- 114 Wood H.G., 1952. A study of carbon dioxide fixation by mass determination of the types of ^{13}C -acetate. Journal of Biological Chemistry 194, 905 - 931.
- 115 Wood H.G., Ragsdale S.W. and Pezacka E., 1986. The acetyl-CoA pathway of autotrophic growth. FEMS Microbiology Reviews 39, 345 - 362.
- 116 Yamamoto S., Alcauskas J.B. and Crozier T.E., 1976. Solubility of methane in distilled water and seawater. Journal of Chemical and Engineering Data 21, 78 - 80.
- 117 Zehnder A.J.B. and Brock T.D., 1979. Methane formation and methane oxidation by methanogenic bacteria. Journal of Bacteriology 137, 420 - 432.
- 118 Zhilina T.N., 1976. Biotypes of *Methanosarcina*. Mikrobiologiya 45, 481 - 489.
- 119 Zeikus J.G., Fuchs G., Kenealy W. and Thauer R.K., 1977. Oxidoreductase involved in cell carbon synthesis of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Journal of Bacteriology 132, 604 - 613.
- 120 Zeikus J.G., Lynd L.H., Thompson T.E., Kryzcki J.A. and Hegge P.W., 1980. Isolation and characterisation of a new, methylotrophic acidogenic anaerobe, the Marburg strain. Current Microbiology 3, 381 - 386.
- 121 Zeikus J.G., 1983. Metabolism of one-carbon compounds by chemotrophic anaerobes. Advances in Microbiology 24, 215 - 299.

Anhang

Kultivierungsmethoden

Flüssigkulturen wurden als Batch-Kulturen in Duran-Flaschen (100, 500, 1000 und 2000 ml Inhalt, Schott, Mainz, BRD) gezogen, die mit einem Butylgummizapfen gasdicht verschlossen werden konnten. Ein in den Butylgummizapfen eingelassener Aufsatz mit Glasgewinde und Butylgummimembran gewährleistete eine einfache Probenentnahme aus der anaeroben Kultur.

Die Kultivation erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 28° C.

Medien und Medienkomponenten

Zusammensetzung des Mediums für Flüssigkulturen:

A) Für fermentierende Organismen

Salzlösung:

NH_4Cl	10 mM	0.535 g/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	2 mM	0.406 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.5 mM	0.074 g/l
NaCl	20 mM	1.166 g/l
KCl	2.5 mM	0.180 g/l
KH_2PO_4	1 mM	0.136 g/l

Die Salze wurden in 960 ml destilliertem Wasser gelöst, mit 4 ml Salzsäure (2 N) versetzt und autoklaviert.

Um ein Zerstören der Vitamine und ein Ausfallen der schwerlöslichen Salze beim Sterilisieren zu verhindern, wurden die Spurenelemente und Vitamine separat autoklaviert, respektive sterilfiltriert. Erst nach dem Sterilisieren der sauren Salzlösung fügte man die folgenden Zusätze in der angegebenen Reihenfolge bei:

0.5 ml	saure Spurenelementlösung		
20 ml	Natriumhydrogenkarbonatlösung	1 M	1.680 g/l
1 ml	Vitaminlösung		
0.5 ml	basische Spurenelementlösung		
1 ml	Resazurin	5 mM	
	in 20 mM Phosphatpuffer pH 7.0		

Resazurin wirkte als Redoxindikator für Potentialwerte um - 200 mV. Das Medium wurde dann mit einem Stickstoff/Kohlendioxid-Gasgemisch (9:1) begast, um den gelösten Sauerstoff auszutreiben.

Danach wurden die Flaschen gasdicht verschlossen, der Gasraum 4 mal evakuiert und mit Stickstoff/Kohlendioxid (9:1) begast.

Der Zusatz von 10 % Kohlendioxid in der Gasphase war notwendig, da sonst laufend Kohlendioxid aus der Kulturflüssigkeit ausgetreten wäre, was zu einer pH-Erhöhung des karbonatgepufferten Mediums geführt hätte.

Am Schluss wurde das Medium mit Sulfid (Endkonzentration 0.25 mM) und Substrat (Konzentration je nach Kohlenstoffquelle 3 bis 30 mM) vervollständigt. Mit 52.2 mg/l Natriumdithionit (0.3 mM) konnte das Medium rasch reduziert werden.

Der geringe Anteil an Restsauerstoff (10 ppm) im Gasgemisch wurde entfernt, indem man das Gas durch einen Hungateofen (46) leitete, der aus einer beheizten Glassäule (100° C) bestand, die mit gesintertem Kupfer (BASF R3-11) als Katalysatormaterial gepackt war. Der sich im Gas befindliche Sauerstoff oxidierte dabei den Katalysator und wurde dadurch aus dem Gasgemisch entfernt.

Saure Spurenelementlösung: (Konzentrierte Stammlösung)

$\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	7.5 mM	1491 mg/l
H_3BO_3	1.0 mM	61.8 mg/l
ZnCl_2	0.5 mM	68.1 mg/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0.45 mM	90.0 mg/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.1 mM	17.0 mg/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1.0 mM	238 mg/l
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1.1 mM	261.8 mg/l

Diese Spurenelemente wurden in 1 Liter Salzsäure (50 mM) gelöst und autoklaviert.

Basische Spurenelemente: (Konzentrierte Stammlösung)

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.2 mM	48.4 mg/l
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ (31 % Se)	0.01 mM	2.55 mg/l
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.01 mM	3.3 mg/l

Diese Spurenelemente wurden in 1 Liter Natronlauge (100 mM) gelöst und sterilisiert.

Vitaminlösung: (Konzentrierte Stammlösung)

Biotin (Vitamin H)	41 μM	10 mg/l
p-Aminobenzoesäure	73 μM	10 mg/l
α -Liponsäure	97 μM	20 mg/l
Folsäure	23 μM	10 mg/l
Pyridoxin-HCl (Vitamin B ₆)	97 μM	20 mg/l
Thiamin-HCl (Vitamin B ₁)	59 μM	20 mg/l
Riboflavin (Vitamin B ₂)	80 μM	30 mg/l
Nicotinsäure (Vitamin B ₃)	406 μM	50 mg/l
D(+)-Ca-Pantothenat (Vitamin B ₅)	63 μM	30 mg/l
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	15 μM	20 mg/l

Die Vitamine wurden in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst, das 16.8 mg NaHCO_3 (0.2 mM) und 4 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.03 mM) enthält. Der pH betrug 6.6. Die Sterilisation erfolgte mittels Mikroporenfilter (0.22 μm , Milipore SA, Buc, Frankreich). Die Vitaminlösung wurde in Portionen zu 4 ml bei - 20° C aufbewahrt.

B) Für sulfatreduzierende Organismen

Für den Abbau unter sulfatreduzierenden Bedingungen wurde dasselbe Medium verwendet. Anstelle von NaCl (20 mM) wurde Na_2SO_4 (20 mM) eingesetzt.

Isolierung von Organismen mit Agarschüttelkulturen

Aus Sedimentproben des Zürichsees wurde durch mehrere Überimpfungen eine stabile Minimalgemeinschaft von Mikroorganismen isoliert, die fähig war, aromatische Verbindungen mit drei Methoxy- oder Hydroxysubstituenten, die sich in bestimmter Position am Aromaten befanden, unter anaeroben Bedingungen vollkommen abzubauen. Die Isolierung von Reinkulturen aus dieser Mischkultur erfolgte mit der Agarschüttelkultur-Technik.

Es wurden dickwandige Reagenzglasgläser (Aussendurchmesser 18 mm) verwendet, die mit einem Butylgummizapfen (Nr. 1) gasdicht verschlossen werden konnten. Die Zusammensetzung des Mediums (8 ml pro Reagenzglas) war dieselbe wie bei den Flüssigkulturen, nur wurden die Konzentrationen der Salze und Zusätze gegenüber dem Flüssigmedium auf das 1.25-fache erhöht. Das Beimpfen erfolgte bei einer Temperatur von 35° C (Wasserbad). Durch Begasen der Glasröhrchen mit einem sauerstofffreien Stickstoff/Kohlendioxid-Gasgemisch (9:1) wurde der Sauerstoffzutritt während des Animpfens verhindert. Das Medium wurde durch Zugabe von 2 ml gewaschenem Agar (5 %; w/v, 70° C) verfestigt. Durch das Beifügen des Agars wurden die Konzentrationen der Salze und Zusätze auf die Werte des Flüssigmediums gesenkt. Die Endkonzentration an Agar betrug in den Reagenzgläsern 1 % (w/v).

Das Medium verfestigte sich etwa 10 Sekunden nach Zugabe des Agars. Die relativ tiefe Temperatur des Agarmediums verhinderte weitgehend Kondenswasserbildung.

Jede Beimpfung wurde in sechs verschiedenen Verdünnungsschritten durchgeführt (10^{-3} bis 10^{-8}). Die Isolierung der Einzelorganismen erfolgte jeweils aus jenem Reagenzglas, in dem nur noch einige wenige Kolonien vorhanden waren. Die betreffenden Kolonien wurden mit einer sterilen Pasteurpipette aus dem Agarpfropf gestochen und in Flüssigkultur (10 ml, verschraubbare Reagenzgläser mit Butylgummizapfen) gebracht und bei 28° C kultiviert.

Reinkulturen wurden in Flüssigmedium kultiviert. Das Animpfen der Flüssigkulturen erfolgte jeweils mit einem Inokulum (1 %; v/v) aus einer Stammkultur, die in einer stationären Phase war.

Bestimmung der Biomasse als optische Dichte und Trockengewicht

Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD) wurden der Kultur jeweils eine Flüssigkeitsprobe von 3 ml entnommen und die Absorption bei 630 nm (OD_{630}) gemessen (Uvikon 810, Kontron AG, Zürich).

Mit der Bestimmung des Trockengewichtes (TG) bei verschiedenen OD_{630} -Werten wurde eine Eichkurve OD_{630} - TG erstellt.

Bestimmung des Trockengewichtes

Der Kultur wurden je nach optischer Dichte 25 ml bis 100 ml Probe entnommen und die OD_{630} bestimmt. Danach wurde diese Kulturflüssigkeit durch ein Mikroporenfilter (0.22 μ m, Millipore SA, Buc, France) gesaugt, das zuvor 12 Stunden bei 100°C getrocknet worden war. Allfällige Salze des Mediums wurden durch Nachspülen mit 10 ml Leitungswasser entfernt. Der Filter wurde dann bei 100° C während 12 Stunden getrocknet. Aus der Gewichtszunahme des Filters liess sich das Trockengewicht pro ml Probe bestimmen und mit der zuvor gemessenen OD_{630} korrelieren. Eine OD_{630} von 1, gemessen mit einer 1 cm Küvette, ergab folgende Trockengewichte: *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich: 791 mg/l, *Pelobacter acidigallici*: 702 mg/l, *Methanococcus mazei*: 957 mg/l.

Für die Berechnung der Kohlenstoffbilanz wurde das Trockengewicht ebenfalls berücksichtigt. Die Zusammensetzung der Biomasse wurde anhand von Elementaranalysen ermittelt. Die Biomasse setzte sich folgendermassen zusammen:

für *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich:

46.9 % C, 7.0 % H, 26.4 % O, 12.7 % N, 1.4 % S, 5.6 % Asche

Biomassenformel: $< C_{3.9} H_{7.0} O_{1.7} N_{0.9} >$

formaler Oxidationszustand des Kohlenstoffs: - 0.23

für *Pelobacter acidigallici*:

49.7 % C, 6.9 % H, 25.2 % O, 11.6 % N, 1.4 % S, 5.2 % Asche

Biomassenformel: $< C_{4.1} H_{6.9} O_{1.6} N_{0.8} >$

formaler Oxidationszustand des Kohlenstoffs: - 0.31

für *Methanococcus mazei*:

48.5 % C, 6.8 % H, 23.6 % O, 13.9 % N, 3.3 % S, 3.9 % Asche

Biomassenformel: $< C_{4.0} H_{6.8} O_{1.5} N_{1.0} >$

formaler Oxidationszustand des Kohlenstoffs: - 0.2

Umrechnung: OD₆₃₀ in Biomasse (*Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich)

$$\text{OD}_{630}^1 = 791 \text{ mg TG/l}$$

$$93.0 \% \text{ davon sind } < \text{C}_{3.9} \text{H}_{7.0} \text{O}_{1.7} \text{N}_{0.9} > \implies$$

$$1 \text{ mg TG} = 0.93 \text{ mg } < \text{C}_{3.9} \text{H}_{7.0} \text{O}_{1.7} \text{N}_{0.9} > \implies$$

$$(\text{formales Molekulargewicht von } < \text{C}_{3.9} \text{H}_{7.0} \text{O}_{1.7} \text{N}_{0.9} > = 93.6)$$

$$\text{OD}_{630}^1 = 7.86 \text{ mMol } < \text{C}_{3.9} \text{H}_{7.0} \text{O}_{1.7} \text{N}_{0.9} >$$

Für *Pelobacter acidigallici* gilt:

$$\text{OD}_{630}^1 = 702 \text{ mg TG/l}$$

$$93.4 \% \text{ davon sind } < \text{C}_{4.1} \text{H}_{6.9} \text{O}_{1.6} \text{N}_{0.8} > \implies$$

$$1 \text{ mg TG} = 0.934 \text{ mg } < \text{C}_{4.1} \text{H}_{6.9} \text{O}_{1.6} \text{N}_{0.8} > \implies$$

$$(\text{formales Molekulargewicht von } < \text{C}_{4.1} \text{H}_{6.9} \text{O}_{1.6} \text{N}_{0.8} > = 92.9)$$

$$\text{OD}_{630}^1 = 7.06 \text{ mMol } < \text{C}_{4.1} \text{H}_{6.9} \text{O}_{1.6} \text{N}_{0.8} >$$

Für *Methanococcus mazei* gilt:

$$\text{OD}_{630}^1 = 957 \text{ mg TG/l}$$

$$92.8 \% \text{ davon sind } < \text{C}_{4.0} \text{H}_{6.8} \text{O}_{1.5} \text{N}_{1.0} > \implies$$

$$1 \text{ mg TG} = 0.928 \text{ mg } < \text{C}_{4.0} \text{H}_{6.8} \text{O}_{1.5} \text{N}_{1.0} > \implies$$

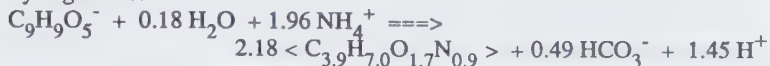
$$(\text{formales Molekulargewicht von } < \text{C}_{4.0} \text{H}_{6.8} \text{O}_{1.5} \text{N}_{1.0} > = 92.8)$$

$$\text{OD}_{630}^1 = 9.57 \text{ mMol } < \text{C}_{4.0} \text{H}_{6.8} \text{O}_{1.5} \text{N}_{1.0} >$$

Stöchiometrien zur Biomassebildung aus verschiedenen Substraten.

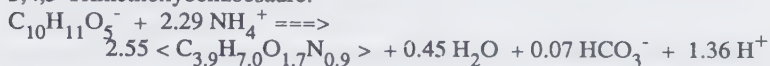
a) Für die angereicherte Mischkultur

Syringasäure:



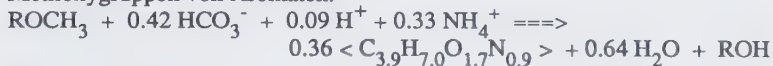
b) Für die definierte Mischkultur bestehend aus *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich und *Pelobacter acidigallici*

3,4,5-Trimethoxybenzoesäure:

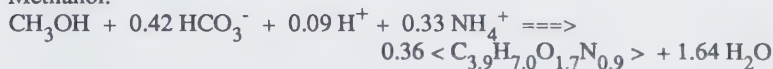


c) Für *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich

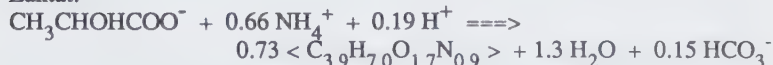
Methoxygruppen von Aromaten:



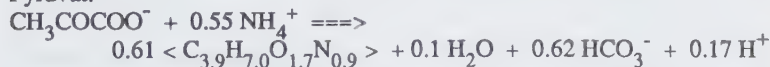
Methanol:



Laktat:

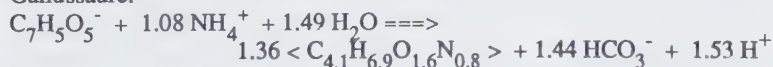


Pyruvat:



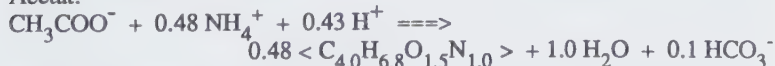
d) Für *Pelobacter acidigallici*

Gallussäure:



e) Für *Methanococcus mazei*

Acetat:



Bestimmung von Phospholipiden in Bakterien

Die Zusammensetzung der Phospholipide aus Reinkulturen von *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich wurde untersucht, um anhand von Markerlipiden Anhaltspunkte über die Bakterienverwandtschaften zu erhalten. Diese Analysen wurden im Labor von Prof. D.C. White, Tallahassee, USA, durchgeführt.

Reinkulturen von *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich wurden aus der Kulturflüssigkeit abzentrifugiert. 1 g Zellen (Nassgewicht) wurden während 2 Stunden mit einem Gemisch aus Chloroform/Methanol/Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.6) (Verhältnis = 2/1/0.8; v/v/v) extrahiert (7). Bei diesen Volumenverhältnissen lag das Gemisch einphasig vor. Dann wurden gleiche Mengen an Chloroform und Wasser zugegeben bis zu einem Verhältnis von $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 1/1/0.9$; v/v/v. Nach 24 Stunden war die Chloroformphase (unten) von der wässrigen Phase getrennt (110). In der Chloroformphase befand sich das gesamte Lipidmaterial. Mittels einer aktivierten Kieselgel-Säule (Unisil, 100 - 200 mesh, Clarkson Chemical Co., Inc. Williamsport, PA, USA) konnten die Fette in drei Gruppen (Neutrallipide, Glycolipide und Phospholipide) aufgetrennt werden. Neutrallipide wurden mit Chloroform, Glycolipide mit Aceton und Phospholipide mit Methanol eluiert. Die Fraktionen wurden gesammelt und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Phospholipide wurden durch eine schwach alkalische Methanolyse in ihre Fettsäureester respektive Hydroxyfettsäureester umgewandelt (109).

Die Fettsäuremethylester wurden von den Hydroxyfettsäuremethylestern durch Dünnschichtchromatographie getrennt. Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgelplatten (20 cm x 20 cm x 250 μm ; Whatman Chemical Separations, Inc., Clifton, NY), als Laufmittel diente ein Gemisch aus Hexan/Diäthyläther/Essigsäure, (70/30/1; v/v/v). Die Alkoholgruppe der Hydroxyfettsäuremethylester wurde mit Heptafluorobuttersäureanhydrid derivatisiert (8, 60, 70). Die Fettsäuremethylester wurden in Hexan aufgenommen und mit einem internen Standard (Methylnonadecanoat, 19:0) versehen.

Die Identifizierung von Fettsäuremethylestern und Hydroxyfettsäuremethylestern (als korrespondierende Heptafluorobuttersäureäther) erfolgte mittels Kapillargaschromatographie aufgrund ihrer Retentionszeiten, die mit Referenzsubstanzen verglichen wurden.

Gerät: Hewlett Packard 5880 A Gaschromatograph mit
Flammenionisationsdetektor (FID)

Säule:	Unpolare kreuzvernetzte Methylsilicon-Kapillarsäule (Länge 50 m, innerer Durchmesser 0.2 mm)
Temperaturprogramm:	50° C bis 160° C, Temperaturanstieg 5° C/min, dann mit 2° C/min auf 300° C
Trärgas:	Wasserstoff

Isolierung von DNS und Bestimmung des GC-Gehaltes

Die Isolierung der DNS erfolgte weitgehend nach der Methode von Marmur (65). Abzentrifugiertes Zellmaterial wurde in 25 ml NaCl-EDTA (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0) gewaschen und mittels French Press (2 x, 100 kp/cm²) aufgeschlossen. Zur Zellsuspension wurde Perchlorsäure (5 M) gegeben, bis eine Endkonzentration von 1 M erreicht war. Dann fügte man die gleiche Menge an Chloroform-Isoamylalkohol (24/1; v/v) zu, schüttelte während 30 Minuten und zentrifugierte danach das Gemisch während 5 Minuten (7000 rpm = 5900 g, Zentrifuge: Sorvall RC-2, Rotor: SS-34, Zentrifugenbecher aus Polyurethan, Dupont, Sorvall). Nach der Zentrifugation bildeten sich drei Phasen, in der obersten befanden sich die Nukleinsäuren. Diese Phase wurde mit einer Pasteurpipette in ein Glasgefäß transferiert. Die Nukleinsäuren wurden mit der doppelten Menge Äthanol gefällt, das Präzipitat abzentrifugiert (gleiche Bedingungen wie oben) und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde in 10 ml verdünnter NaCl-Citrat-Lösung (ein Zehntel der Standardkonzentration) gelöst und durch Zufügen von konzentrierter NaCl-Citratpuffer-Lösung auf Standardkonzentration (0.15 M NaCl, 0.015 M Trinatriumcitrat; v/v, pH 7.0) gebracht. Dann fügte man die gleiche Menge an Chloroform-Isoamylalkohol (24/1; v/v) zu, schüttelte während 30 Minuten und zentrifugierte danach das Gemisch während 5 Minuten (gleiche Bedingungen wie oben). Dieser Deproteinierungsschritt wurde solange wiederholt, bis kein Protein mehr in der Zwischenphase zu finden war.

Die gereinigten Nukleinsäuren wurden in NaCl-Citratpuffer aufgenommen, mit 50 µg Ribonuclease/ml (Fluka AG, Buchs) versetzt und bei 37° C (Wasserbad) während 30 Minuten inkubiert. Die Proteinextraktion wurde nach der RNS-Verdauung wiederholt, ebenso die RNS-Verdauung, bis kein Protein mehr in der Zwischenphase zu finden war. Nach der letzten Behandlung mit Äthanol wurde das Präzipitat in 9 ml NaCl-Citratpuffer gelöst und mit 1 ml Acetat-EDTA (3 M Natriumacetat, 0.001 M EDTA; v/v, pH 7.0) versehen. Die DNS wurde durch Zugabe von 10 ml Isopropylalkohol präzipitiert und abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit Äthanol (70 %,

85 % und 95 %) 3 x gewaschen und in NaCl-Citratpuffer gelöst. Der G+C-Gehalt konnte aufgrund der maximalen Absorption zwischen 230 und 290 nm bestimmt werden (100). Eine eigene Kalibrierung mit einem Referenzorganismus wurde nicht durchgeführt.

Isolierung und Bestimmung von Cytochromen

Die Isolierung von Cytochromen erfolgte weitgehend nach der Methode von Widdel (111). Abzentrifugiertes Zellmaterial wurde mit Phosphatpuffer (50 mM, pH 7.0) gewaschen und mittels French Press (2x, 100 kp/cm²) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer und Membranfragmente wurden mittels Zentrifugation entfernt (15 Minuten, 12500 rpm = 18800 g, Zentrifuge: Sorvall RC-2, Rotor: SS-34).

Der Nachweis von Cytochromen erfolgte durch ein Differenzspektrum (400 bis 600 nm). Durch die Aufarbeitung der Cytochrome lagen diese bereits im oxidierten Zustand vor. Die Cytochrome in der Probenküvette wurden mit Natriumdithionit reduziert. Das Auftreten von Absorptionsmaxima im Differenzspektrum bei 421, 522 und 554 nm bei *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich liess auf das Vorhandensein von Cytochromen schliessen. Da sich das Cytochrom mit einem Aceton-HCl-Gemisch extrahieren liess, handelte es sich um ein b-Typ-Cytochrom (111).

Spektren

Die Ringspaltung oder die Umwandlung von Aromaten während des Abbaus wurde durch UV-Spektroskopie (200 - 350 nm) verfolgt. Die Spektren der Nährlösung lieferten schon während des Wachstums der Organismen gute Angaben über die Geschwindigkeit des Aromatenabbaus. Eine genaue Analyse mit quantitativer Bestimmung der Aromaten erfolgte mittels Hochdruckflüssigchromatographie.

Für die Aufnahme der Spektren wurden Quarzküvetten (1 cm) verwendet. Die Proben wurden vor der Messung (Uvikon 810, Kontron AG, Zürich) mit Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.0) 50-fach verdünnt.

Die optische Dichte der Kulturen wurde im Probenraum für stark streuende Proben gemessen. Diese Zusatzausrüstung erlaubte eine Positionierung der Küvetten unmittelbar vor dem Photomultiplier. Die durch Streuung verursachten Absorptionsverluste können damit möglichst klein gehalten werden, sodass nur die effektive Absorption der Zellen gemessen wird.

Bestimmung von Sulfid

Die Bestimmung von Sulfid erfolgte nach der Methode von Gilboa-Garber (36):

Sulfid (H_2S) wird als Zinksulfid (ZnS) gefällt. Durch Zugabe einer stark sauren Lösung von 4-Amino-N,N-dimethylanilinsulfat wird H_2S freigesetzt. H_2S reagiert mit dem Diamin zur reduzierten farblosen Form von Methylblau, Fe^{3+} -Ionen oxidieren diese zur blauen Form, deren Konzentration photometrisch bestimmt werden kann.

Reagenzien:

Zinkacetat-Reagenz: 4 % Zinkacetat (w/v) in 2 % Essigsäure (v/v)

Lösung I:
 4 g 4-Amino-N,N-dimethylanilinsulfat
 $(\text{CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{NH}_2\text{H}_2\text{SO}_4$ MG = 234.28
 400 ml H_2SO_4 (konz.)
 600 ml H_2O dest.

Lösung II:
 10 g Ammoniumeisen(III)-sulfat
 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$ MG = 964.39
 20 ml H_2SO_4 (konz.)
 980 ml H_2O dest.

Lösung III: Gleiche Volumenteile von Lösung I und II
 (Die Lösung ist nur wenige Stunden haltbar)

Vorgehen: Zu 0.4 ml Probe wurden 3.6 ml sauerstofffreies Wasser und 0.5 ml Zinkacetatlösung hinzugefügt. Stark sulfidhaltige Proben wurden 10 oder 100 mal mit sauerstofffreiem Wasser verdünnt. Durch Zugabe von 0.5 ml Lösung III wurde die Reaktion ausgelöst. Die entstehende Färbung wurde nach 30 Minuten photometrisch bei 665 nm bestimmt. (Uvikon 810, Kontron AG, Zürich).

Umrechnung:

$$\frac{\text{Absorption}_{665}}{0,021} = \mu\text{M Sulfid}^*$$

* = In der Kulturflüssigkeit (pH 7.0) lag das Sulfid als H_2S und HS^- vor.

Die Eichung erfolgte mit einer Sulfidlösung bekannter Konzentration.

Die Sulfidkonzentration der Eichlösung wurde durch jodometrische Titration ermittelt, da die käuflichen Natriumsulfidkristalle eine nicht genau bestimmte Menge an Wasser enthielten ($\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$).

Der Kurvenverlauf der Eichgerade war im Messbereich von 0.05 mM bis 0.25 mM linear. Bei höheren Sulfidkonzentrationen wurden die Proben entsprechend verdünnt, sodass die Absorption⁶⁶⁵ in den Bereich von 0.1 bis 0.5 zu liegen kam. Die Genauigkeit betrug 4 %.

Bestimmung des Sulfidgehaltes der Sulfidstammlösung

In einen Erlenmeyerkolben wurden 25 ml Kaliumjodatlösung (0.01 N), 250 mg Kaliumjodid und 50 ml der Sulfidstammlösung gegeben und mit 5 ml Säuregemisch ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O} = 1/1/8$; v/v/v) versetzt. Das freigesetzte Jod wurde mit einer Natriumthiosulfatlösung (0.02 N) bis zur Entfärbung titriert, wobei kurz vor Erreichen des Endpunktes 1 ml Stärkelösung (5 mg/ml) zugegeben wurde. In gleicher Weise wurde eine Blindprobe (ohne Sulfidstammlösung) angesetzt und titriert. Aus der Differenz zwischen dem Thiosulfatverbrauch der Blindprobe und der Probe konnte die Sulfidmenge berechnet werden.

Es gilt: Verbrauch von 1 ml Natriumthiosulfat (0,02 N) entsprechen 10 μMol Sulfid.

Bestimmung des Gramtyps

Die Gramtypbestimmung wurde mit dem Kaliumhydroxydtest durchgeführt. Abzentrifugiertes Zellmaterial wurde auf einen Objektträger gegeben und mit einem Tropfen KOH (3 %) versehen. Mit einer Impföse wurde das Zellmaterial in der Kaliumhydroxydlösung zerrieben. Nach 10 Sekunden entstand bei gramnegativen Zellen ein visköser Schleim, der bis zu 5 cm gedehnt werden konnte. War dies nicht der Fall, so handelte es sich um grampositive Zellen (38).

Zur Kontrolle wurden je ein grampositiver (*Acetobacterium woodii*) und ein gramnegativer Stamm (*Desulfovibrio vulgaris*) analysiert.

Analyse von Stoffwechsel-Zwischenprodukten

100 ml Probe wurden der Kulturflüssigkeit entnommen, mit 1 ml HCl (konz.) versehen und bis zur weiteren Verarbeitung bei - 20° C eingefroren. Aufgetaute Zellen wurden mit der French Press aufgebrochen (2 Durchgänge, Druck: 500 kg/cm²). Die Zellsuspension wurde mit 200 µl internem Standard (C₂₆-Methylester) versehen und 3 x mit 25 ml Diäthyläther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherextrakte wurden in einem Rundkolben für 2 Stunden stehen gelassen, dabei setzte sich das in Äther gelöste Wasser an der Glaswand ab. Der überstehende Äther wurde mit einer Pasteurpipette entnommen, in ein anderes Glasgefäß transferiert und die Probe im Stickstoffstrom getrocknet.

Der Rückstand wurde in Methanol/Pentan (1/1) aufgenommen und mit Kapillargaschromatographie analysiert.

Bedingungen für die Kapillargaschromatographie zur Analyse von Stoffwechsel-Zwischenprodukten

Gerät:	Fractovap 2101 AC (Carlo Erba Strumentazione, Rodano, Italy)
Säule:	Glassäule, 4 % PS-255, (Länge 15 m, innerer Durchmesser 0.32 mm, EAWAG, Dübendorf)
Trärgas:	Wasserstoff (1 kg/cm ²)
Temperaturprogramm:	50° C während 3 Minuten isotherm, dann Temperaturanstieg auf 230° C mit 3.5° C/min, dann 230° isotherm während 30 Minuten
Injektortemperatur:	225° C
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID), Temperatur 240° C, (0.5 kg/cm ² , 1 kg Luft/cm ²)
Massenspektrometer:	Finnigan

Analyse der flüchtigen Fettsäuren

Zur Analyse der flüchtigen Fettsäuren wurde der Kultur eine Flüssigkeitsprobe entnommen und 0.5 ml davon in einem Eppendorf-Röhrchen mit 50 µl NaOH (2N) versetzt, eingefroren (-20° C) und bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Als Salze waren diese Substanzen mehrere Monate haltbar.

Zur Analyse wurden die Salze der Fettsäuren mit 0.5 ml Ameisensäure (konz.) versehen und wieder in die Säureform umgewandelt. Je 1 µl davon wurde gaschromatographisch untersucht.

Bedingungen für die Gaschromatographie

Gaschromatograph:	Shimadzu GC-7AG (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)
Säulenpackmaterial:	Carbopack C 60/80 mesh, 0.3 % Carbowax 20 M, 0.1 % H ₃ PO ₄ (Supelco Inc., Bellefonte PA, USA)
Trärgas:	Stickstoff 52 gesättigt mit Ameisensäuredampf (Carba Gas, Bern)
Gasfluss:	50 ml/min
Injektortemperatur:	200° C
Temperaturprogramm:	120° C isotherm (für Essigsäure), für längerkettige Fettsäuren wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet: 120° C während 4 Minuten isotherm, Temperatur- anstieg auf 200° C mit 12° C/min, 200° C isotherm während 8 Minuten
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID), Betriebstempe- ratur 200° C (0.5 kg H ₂ /cm ² , 0.5 kg Luft/cm ²)
Integrator:	Spectra-Physics-Minigrator (Santa Clara PA, USA)

Quantifizierung: 0.5 ml Ansätze mit verschiedenen Fettsäurekonzentrationen wurden mit 50 µl NaOH (2N) versetzt, dann mit 0.5 ml Ameisensäure (konz.) wieder protoniert und je 1 µl unter den zuvor beschriebenen Bedingungen analysiert. Die Integrationseinheiten der einzelnen flüchtigen Fettsäuren, aufgetragen gegen die jeweilige Konzentration, ergaben eine für

jede Fettsäure spezifische Eichkurve. Bei der Verwendung von Ameisensäure als Lösungsmittel war immer ein Hintergrundsignal von Essigsäure (0.05 mM) vorhanden, da auch die reinste Ameisensäure noch Essigsäure enthielt. Im linearen Messbereich von 0.5 mM bis 30 mM liessen sich die Fettsäuren mit einer Genauigkeit von 0.1 mM mit einer Streuung von 1.5 % bestimmen. Bei Konzentrationen unter 0.5 mM betrug die Streuung 3.5 %. Die Identifizierung der flüchtigen Fettsäuren erfolgte aufgrund ihrer Retentionszeiten, die mit den Referenzsubstanzen verglichen wurden.

Analyse von Alkoholen

Die Bestimmung und Quantifizierung von Alkoholen erfolgte ebenfalls gaschromatographisch.

Bedingungen der Gaschromatographie

Gaschromatograph:	Shimadzu GC-7AG (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)
Säulenpackmaterial:	Porapak QS 80/100 mesh, (Supelco Inc. Bellefonte PA, USA)
Trärgas:	Stickstoff 52 (Carba Gas, Bern)
Gasfluss:	50 ml/min
Injektortemperatur:	200° C
Temperaturprogramm:	150° C isotherm
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID), Betriebstemperatur 200° C (0.5 kg H ₂ /cm ² , 0.5 kg Luft/cm ²)
Integrator:	Shimadzu RPR-G1

Die Eichung erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen des gesuchten Alkohols, dem zuvor wie den Proben 5 % HCl (2N) zugegeben wurde. Je 1 µl wurde unter den beschriebenen Bedingungen analysiert. Für Methanol und Äthanol konnte ein linearer Messbereich von 1 bis 50 mM gefunden werden. Isopropanol, Butanol und Aceton lagen im Bereich 1 bis 10 mM ebenfalls im linearen Messbereich. Die Erfassungsgrenze lag bei 0.2 mM mit einer Genauigkeit von 2 %. Die Identifizierung der Alkohole erfolgte aufgrund ihrer Retentionszeiten, die mit den Referenzsubstanzen verglichen wurden.

Analyse von Methan

Die Probenentnahme erfolgte mit einer gasdichten Spritze. Nach dem Durchstechen der Butylgummimembran wurde aus dem Gasraum der Kulturf Flasche eine Gasprobe entnommen und mit Hilfe einer Probenschlaufe (0.18 ml) auf die Säule aufgetragen.

Bedingungen der Gaschromatographie

Gaschromatograph:	Shimadzu GC-R1A (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)
Säulenpackmaterial:	MS 5A 80/100 mesh, (Supelco Inc. Bellefonte PA, USA)
Trärgas:	Stickstoff 52 (Carba Gas, Bern)
Gasfluss:	50 ml/min
Injektortemperatur:	200° C
Temperaturprogramm:	200° C isotherm
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID), Betriebstemperatur 200° C (0.5 kg H ₂ /cm ² , 0.5 kg Luft/cm ²)
Integrator:	Shimadzu RPR-G1

Zur Eichung und Identifizierung der Gase wurde ein Eichgas (Supelco Inc., Bellefonte PA, USA) verwendet, welches wie eine gewöhnliche Gasprobe über eine geeichte Probenschleife auf die Säule gebracht wurde. Die Methanmessung zeigte einen linearen Messbereich von 0 bis 100 % Methan (12). Die Erfassungsgrenze lag bei 0.2 µMol mit einer Genauigkeit von 0.5 %. Die gaschromatographische Methanmessung mit FID-Detektion stellt eine sehr sensitive Methode dar, mit der selbst der Methangehalt der Luft (ungefähr 2 ppm) bestimmt werden kann.

Analyse von Wasserstoff

Die Proben wurden ebenfalls mit einer gasdichten Spritze aus dem Gasraum der Kulturflasche entnommen. Zur Analyse wurden 0.2 ml dieser Gasprobe mit einer Spritze (Pressure-Lok) auf die GC-Säule gebracht.

Bedingungen der Gaschromatographie

Gaschromatograph:	Shimadzu GC-R1A (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)
Säulenpackmaterial:	Carbosieve S 120/140 mesh, (Supelco Inc. Bellefonte PA, USA)
Trägergas:	Stickstoff 52 (Carba Gas, Bern)
Gasfluss:	50 ml/min
Injektortemperatur:	200° C
Temperaturprogramm:	200° C isotherm
Detektor:	Wärmeleitfähigkeitsdetektor, Betriebstemperatur 250° C, Stromstärke 40 mA
Integrator:	Shimadzu RPR-G1

Die Eichung erfolgte mit einer modifizierten Gasblase (Supelco Inc., Bellefonte PA, USA) von bekanntem Inhalt (267 ml). Die Blase wurde mit Stickstoff gespült und mit einem Butylgummiseptum verschlossen. Danach wurden verschiedene Mengen an Wasserstoff (0.2 - 2.83 %) in die Gasblase injiziert. Von diesem Eichgas wurden 0.2 ml auf die GC-Säule gebracht. Wasserstoff zeigte eine sehr gute Linearität von 0 bis 100 %. Die Streuung, die durch ungenaue Einspritzungen verursacht wurde, war klein (33).

Identifizierung und Konzentrationsbestimmung von aromatischen Substanzen

Die spektroskopische Analyse lieferte nicht immer genügend Informationen über die Vorgänge während des Abbaus von Aromaten. So konnte beispielsweise die Demethylierung von Syringasäure zu 3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzoesäure oder zu Gallussäure nicht verfolgt werden, da alle drei Substanzen sehr ähnliche Absorptionsspektren aufweisen.

Die aromatischen Substanzen wurden deshalb mittels einer Hochdruck-

flüssigchromatographie aufgetrennt.

Zur Analyse der Aromaten wurde der Kultur eine Flüssigkeitsprobe von 1 ml entnommen und mit 50 µl Salzsäure (2N) versehen. Das Ansäuern der Probe verhinderte ein Oxidieren der Aromaten. Die Proben konnten unter diesen Bedingungen bis zur weiteren Analyse bei - 20° C gelagert werden.

Vor der Analyse wurden die aufgetauten Proben mit 50 µl Natronlauge (2 N) neutralisiert und mit Hilfe einer geeichten Probenschlaufe (0.25 ml) auf die HPLC-Säule gebracht.

Bedingungen der Hochdruckflüssigchromatographie

Säule:	RP-C ₈ (Reverse Phase-Säule, Lichrosorb RP-8), Säulenlänge 250 mm, Innendurchmesser 4 mm (E. Merck, Darmstadt, BRD)
Laufmittel:	Methanol/Acetonitril/Wasser (23.5 / 4.7 / 71.8; v/v/v) angesäuert mit Ameisensäure (Endkonzentration 10 mM, pH 3.0)
Flussrate:	1 ml/min
Detektor:	Ultraviolett-Detektor mit verstellbarer Wellenlänge (Uvikon LCD 725 Spektralphotometer, Kontron AG, Zürich), Messwellenlänge: 260 nm

Zur Eichung und Identifizierung wurden Reinsubstanzen verwendet (Fluka AG, Buchs). Der Kurvenverlauf der Eichgeraden war im Messbereich von 0.1 bis 5 mM linear. Die Genauigkeit betrug 0.1 mM, die Streuung 4 %. Probleme bereitete die Separierung von Gallussäure, Pyrogallol und Phloroglucinol. Diese drei Substanzen eluierten praktisch gleichzeitig und liessen sich daher mit dem vorhandenen Ansatz nicht sauber voneinander trennen. Wurde als Laufmittel ein Phosphatpuffer (200 mM, pH 2.2)/Methanol-Gemisch (90/10) verwendet, konnte eine gewisse Separierung von Gallussäure, Pyrogallol und Phloroglucinol erreicht werden, sofern Pyrogallol in nicht zu grosser Konzentration vorlag. Eine Separierung von Pyrogallol und Phloroglucinol war aber nicht möglich. Die Identifizierung der übrigen Substanzen erfolgte aufgrund ihrer Retentionszeiten, die mit den Referenzsubstanzen verglichen wurden.

Analyse von Carbonsäuren und Zuckern

Carbonsäuren, Zucker und Zwischenprodukte aus dem Aromatenabbau wurden ebenfalls mit Hochdruckflüssigchromatographie analysiert.

Der Kulturflüssigkeit wurde 1 ml Probe entnommen und mit 50 μ l HCl (2 N) versehen. Unter diesen Bedingungen liessen sich die Proben bis zur weiteren Analyse bei - 20° C lagern.

Die Auftrennung der Substanzen erfolgte mit Hochdruckflüssigchromatographie. Die Proben wurden mit Hilfe einer geeichten Probenschleife (25 μ l) auf die HPLC-Säule gebracht.

Bedingungen der Hochdruckflüssigchromatographie

Säule: HPX-87H = Kationentauschersäule, die die Substanzen aufgrund ihres pKs-Wertes auftrennt. Damit die Säule immer in der H⁺-Form vorliegt, muss das Elutionsmittel einen pH-Wert von weniger als 3 aufweisen. (Bio Rad Laboratories, Richmond, Calif., USA)

Laufmittel: H₂SO₄ (5 mM)

Flussrate: 0.8 ml/min

Detektor: Refraktometer (Knauer-Differential-Refraktometer, Berlin, BRD), respektive Ultraviolett-Detektor mit verstellbarer Wellenlänge (Uvikon LCD 725 Spektralphotometer, Kontron AG, Zürich)
Messwellenlänge: 210 nm

Die Detektion der Zucker erfolgte mit dem Refraktometer, jene der Carbonsäuren mit dem Ultraviolett-Detektor.

Zur Eichung und Identifizierung wurden Reinsubstanzen verwendet:

(Glucose, Fructose, Laktat und Succinat von Fluka AG, Buchs; Pyruvat von Boehringer GmbH, Mannheim, BRD; α -Ketoglutarat von Calbiochem, San Diego, USA).

Der Kurvenverlauf der Eichgeraden war im Messbereich von 0.5 mM bis 30 mM linear. Die Genauigkeit betrug 0.1 mM, die Streuung 4 %. Konzentrationen unter 0.25 mM konnten zwar immer noch erfasst werden, die Quantifizierung war aber ungenau.

Formiat war bei einer Konzentration von grösser als 0.25 mM mit dem

Refraktometer messbar. Die Eichung war oberhalb 0.5 mM linear, die Streuung betrug 3 %. Da die übrigen flüchtigen Fettsäuren viel genauer und mit grösserer Empfindlichkeit mit dem Gaschromatographen untersucht werden konnten, wurden die flüchtigen Fettsäuren gaschromatographisch analysiert und quantifiziert. Formiat konnte allerdings nicht gaschromatographisch bestimmt werden, da die Fettsäuresalze vor der Analyse mit Ameisensäure (13.25 M Endkonzentration) in den flüchtigen Zustand überführt wurden. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte aufgrund ihrer Retentionszeiten, die mit denen von Referenzsubstanzen verglichen wurden.

Bestimmung der Kohlenstoffbilanz

Um festzustellen, wieviel Kohlenstoff (C) während des Abbaus eines angebotenen Substrates in den analysierten Produkten wiedergefunden werden konnte und zur Festlegung von Abbaustöchiometrien, wurden bei einigen Versuchen Kohlenstoffbilanzen berechnet.

Dazu wurden bei jeder Probenentnahme alle erfassbaren Substanzen (Aromaten, Alkohole, Zucker, flüchtige Fettsäuren, Methan und OD_{630}) quantitativ ermittelt, als "Konzentrationen an C-Atomen" umgerechnet und für jeden Messpunkt die so ermittelten C-Anteile der erfassten Produkte zusammengezählt.

Für die Berechnung des C-Anteils in der Biomasse wurde die Annahme getroffen, dass die gemessene OD_{630} sich proportional zum Trockengewicht (TG) verändere.

Für *Desulfotomaculum orientis* Stamm Zürich galt: $OD_{630}^1 = 791 \text{ mg TG/l}$

und 93 % des Trockengewichtes entsprachen $< C_{3.9} H_{7.0} O_{1.7} N_{0.9} >$ (siehe Seite 68)

Die Analyse der Biomassenzusammensetzung erfolgte durch eine Verbrennung gefriergetrockneter Zellen mittels organischer Mikroanalyse. Die freigesetzten Elemente (Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff) sowie die zurückgebliebene Asche wurden quantifiziert. Der Sauerstoffgehalt wurde aus der Differenz zwischen der Summe der prozentualen Anteile dieser Elemente inklusive Asche und 100 % berechnet.

Für die Ermittlung der Biomassenformel wurde ein Molekulargewicht der Biomasse von 100 angenommen. Die Koeffizienten von Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff berechnet man aus den prozentualen Gewichtsanteilen dieser Elemente in der Biomasse, dividiert durch das jeweilige Atomgewicht.

Da sich die Biomassenzusammensetzung der untersuchten Organismen nicht signifikant unterschied, wurde für die Berechnung der Biomasse der Mischkultur die Zusammensetzung von *Desulfohalomaculum orientis* Stamm Zürich verwendet.

Da durch die Säurebildung während des Aromatenabbaus aus dem Bicarbonatpuffer Kohlendioxid ausgetrieben wurde, stimmte die gemessene Kohlendioxidkonzentration nicht mit der im Stoffwechsel aus dem Substrat produzierten Menge überein. Daher wurde bei der Berechnung der Kohlenstoffbilanz die Kohlendioxidkonzentration aus der stöchiometrischen Substratabbau-Gleichung und dem gemessenen Methangehalt berechnet. Der stöchiometrische Abbau von Syringasäure ergibt z.B. gleiche Anteile an Methan und Kohlendioxid.



Der Kohlenstoffanteil, der durch die Probenentnahmen aus dem System entfernt wurde, wurde bei der Berechnung der Kohlenstoffbilanz ebenfalls berücksichtigt.

Um auch den C-Anteil von unbekannten Zwischenprodukten bei den Probenentnahmen einzubeziehen, berechnete man den C-Verlust wie folgt:

Der totale C-Anteil blieb im geschlossenen System während des ganzen Versuches konstant. Der Flüssigkeit entwichen nur die Endprodukte Methan und Kohlendioxid. Für jeden Zeitpunkt entsprach also der C-Anteil in der Flüssigkeit dem Anfangswert minus dem bis zu diesem Zeitpunkt total produzierten Methan und Kohlendioxid.

Die Entnahmevolumina betrugen jeweils 5 ml. Mit jeder Probenentnahme wurde folgender C-Anteil aus dem System entfernt:

$0.005\text{ l} * (\text{C-Anteil zu Beginn des Versuches} - \text{C-Anteil im produzierten Methan und Kohlendioxid})$

Berechnung der produzierten Gasmenge

Die Zusammensetzung der Gasphase und die Konzentration der einzelnen Gase wurde gaschromatographisch durchgeführt (siehe Analyse von Methan, Seite 78). Die freigesetzten Gase (Methan und Kohlendioxid) bewirkten einen Überdruck im Kulturgefäß. Mit einer geeichten, gasdichten Spritze konnte nach dem Durchstechen der Gummimembran der Druck in der Kulturflasche auf Aussendruck gebracht werden. Das Gasvolumen (V_g), das dabei in die Spritze gepresst wurde, entsprach der gebildeten Gasmenge zwischen dieser und der letzten Messung.

Symbole und Abkürzungen:

$[CH_4]$ = Methankonzentration in der Gasphase , (mMol/l)

P_F = Gasdruck in der Kulturflasche = $P_A * \frac{V_G + V_S}{V_G}$, (Torr)

$P_{F(x)}$ = P_F am Tage x , (Torr)

P_A = lokaler Atmosphärendruck , (Torr)

$P_{A(x)}$ = P_A am Tage x , (Torr)

$V_{G(x)}$ = Volumen in der Gasphase in der Kulturflasche nach der x-ten Probenentnahme , (Liter)

V_S = Volumen in der Spritze , (Liter)

α_{CH_4} = Bunsenkoeffizient Löslichkeit von CH_4 bei 28° C in dest. Wasser
= 0,02994 l CH_4 /l, (116)

V_F = Volumen der Kulturflüssigkeit , (Liter)

$V_{F(x)}$ = V_F am Tage x , (Liter)

Die gesamte Menge an CH_4 wurde folgendermassen berechnet:

$CH_4 \text{ tot} = CH_4 \text{ in der Gasphase} + CH_4 \text{ gelöst} , (\text{ mMol})$

oder $CH_4 \text{ tot} = [CH_4] * \frac{P_F}{P_A} * V_G + [CH_4] * \frac{P_F}{P_A} * \alpha_{CH_4} * V_F , (\text{ mMol})$

oder $CH_4 \text{ tot} = [CH_4] * \frac{P_F}{P_A} * [V_G + \alpha_{CH_4} * V_F] , (\text{ mMol})$

für das Methan in der Gasphase galt:

$$[CH_4] * \frac{P_F}{P_A} * V_G = [CH_4] * V_G \text{ (unter Atmosphärendruck) , (mMol)}$$

für das gelöste Methan galt:

$$[CH_4] * \frac{P_F}{P_A} * \alpha_{CH_4} * V_F , \text{ (mMol)}$$

Der Methanzuwachs seit der letzten Messung berechnete sich aus der Methanmenge zum Zeitpunkt der Messung (x) abzüglich der Methanmenge, die bei der vorhergehenden Messung (x-1) schon vorhanden war.

Neu gebildetes Methan:

$$\Delta CH_4 = [CH_4]_{(x)} * \frac{P_{F(x)}}{P_A} * (V_{G(x)} + \alpha_{CH_4} * V_{F(x)}) - [CH_4]_{(x-1)} * \frac{P_{A(x-1)}}{P_A} * (V_{G(x)} + \alpha_{CH_4} * V_{F(x)}) , \text{ (mMol)}$$

Die Gesamtmenge an Methan, die während der ganzen Versuchszeit gebildet wurde, berechnete sich aus der Summe der einzelnen Methanzuwächse jeder Messung (x).

$$CH_4 \text{ tot} = \sum_{x=1}^n \{ \Delta CH_4 \} , \text{ (mMol)}$$

oder

$$CH_4 \text{ tot} = \sum_{x=1}^n \left\{ [CH_4]_{(x)} * \frac{P_{F(x)}}{P_A} * (V_{G(x)} + \alpha_{CH_4} * V_{F(x)}) - [CH_4]_{(x-1)} * \frac{P_{A(x-1)}}{P_A} * (V_{G(x)} + \alpha_{CH_4} * V_{F(x)}) \right\} , \text{ (mMol)}$$

N.B. Da neben dem Gasvolumen der Kultur auch Flüssigkeitsproben entnommen wurden, vergrößerte sich der Gasraum in der Flasche mit jeder Probenentnahme um 5 ml. (So entsprach das Volumen $V_{G(x)}$ dem Volumen $V_{G(x-1)} + 5 \text{ ml u.s.w.}$).

Curriculum vitae

Jean-Pierre Kaiser, geboren am 17. September 1956 in Arbon (TG) als Sohn des Walter Kaiser, Gärtnermeister, und der Madeleine geborene Ledérrey. Bürger von Degersheim (SG).

Ausbildung:

1964 - 1970	Primarschule in Arbon
1970 - 1973	Sekundarschule in Arbon
1973 - 1976	Oberrealschule der Kantonsschule Romanshorn
1976	Abschluss mit Maturität Typus C
1976 - 1982	Studium an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich mit Hauptfach Mikrobiologie
1982	Diplom als Naturwissenschaftler
1982 - 1987	Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. R. Bachofen Seit 1982 Assistent in verschiedenen Kursen und Praktika
1983	Aufenthalt an der Florida State University, Tallahassee, USA

Während meiner Studienzeit besuchte ich Vorlesungen bei folgenden Damen und Herren an der Universität Zürich und nahm an deren Kursen, Exkursionen, Übungen und Seminarien teil.

F.W.Arndt, R.Bachofen, E.Batschelet, Th.Baumann, W.Berchtold, J.Biegert, M.A.Billeter, A.Binder, M.Birstiel, H.R.Bosshard, E.Brun, H.Burla, P.S.Chen, Ph.Christen, C.D.K.Cook, A.Dübendorfer, L.Ettlinger, C.H.Eugster, H.Gehring, W.Giger, J.R.Günter, K.Hanselmann, H.Heimgartner, H.R.Hohl, R.Honegger, R.Humbel, R.Hütter, E.Jungen, J.Kägi, H.Kummer, T.Leisinger, K.Lerch, P.F.Meier, G.Mindek, J.Müller, H.R.Oswald, R.Parish, H.R.Preisig, D.Rast, W.Reichart, H.Rieber, P.Rüedi, H.P.Ruffner, W.Schmidt, K.Schneider, H.R.Schwarz, M.Snozzi, H.Sonderegger, A.Steiner, W.Stumm, J.D.Tacier, H.Wanner, H.Weber, R.Weohner, Ch.Weissmann, K.Wilson, A.Zehnder, V.Ziswiler.

Verdankung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. R. Bachofen für sein Interesse an dieser Arbeit sowie für die hilfreichen Vorschläge danken.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. K. Hanselmann für die zahlreichen Diskussionen und Denkanstösse und für seine gewährte Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit.

Dann danke ich allen Kollegen, die mich während meiner Arbeit mit Rat und Tat unterstützt haben.

Im weiteren gilt mein Dank der Firma Ciba-Geigy AG, Basel, die mir einen Kapillargaschromatographen zur Verfügung stellte, Herrn C. Schaffner von der EAWAG, Dübendorf, für die Anfertigung von Massenspektren, Herrn H. Frohofer vom Organisch-chemischen Institut der Universität Zürich für die Durchführung der Mikroanalyse der Bakterienbiomasse und Herrn Prof. D.C. White von der Florida State University, Tallahassee, USA, in dessen Labor ich die betreffenden Bakterien auf ihre Lipidzusammensetzung untersuchen konnte.

Die Arbeit wurde finanziell unterstützt durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt Nr. 3.434-0.83) und durch das Eidgenössische Departement des Innern (Projekt Cost).

